



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**FUNCIÓN DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA
EXTRACELULAR (SOD3) EN EL ENDOTELIO
TUMORAL. IMPLICACIONES SOBRE LA EFICACIA
DE LA QUIMIOTERAPIA Y LA MIGRACIÓN DE
LINFOCITOS T**

TESIS DOCTORAL
LORENA CARMONA RODRÍGUEZ

2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FUNCIÓN DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA EXTRACELULAR (SOD3) EN EL ENDOTELIO TUMORAL. IMPLICACIONES SOBRE LA EFICACIA DE LA QUIMIOTERAPIA Y LA MIGRACIÓN DE LINFOCITOS T

Memoria presentada por **Lorena Carmona Rodríguez**

Licenciada en Biología

Para optar al grado de doctor en Biociencias Moleculares

CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA-CSIC

MADRID, 2017

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Immunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) bajo la codirección de los doctores Santos Mañes Brotón y Emilia Mira Dámaso.

Lorena Carmona Rodríguez ha disfrutado de una beca FPU (FPU12/03321) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

**A mis abuelos, Luis y Manoli,
mi madre y Paco,
y mis hermanos Belén y Sergio.**

Siempre merece la pena intentarlo...

ÍNDICE

ABREVIATURAS	17
RESUMEN	23
ABSTRACT	27
INTRODUCCIÓN	
1. La reacción inflamatoria en el cáncer	31
1.1. Infiltrado inflamatorio: composición e implicaciones	
1.2. Tráfico de leucocitos en el tumor	
2. Angiogénesis tumoral	35
2.1. Características estructurales y funcionales de la vasculatura tumoral	
2.2. Efectos de la normalización de la vasculatura tumoral sobre la quimioterapia e inmunoterapia del cáncer	
2.3. Papel de la VE-cadherina (VEC) en la función barrera del endotelio tumoral	
2.4. Activación de NF-κB en las células endoteliales	
3. Las estatinas como agentes anti-inflamatorios y anti-tumorales	41
3.1. Efectos anti-inflamatorios de las estatinas	
3.2. Efectos anti-tumorales de las estatinas	
4. Superóxido dismutasa extracelular (ECSOD, SOD3)	43
4.1. Estructura y localización de la SOD3	
4.2. Regulación de la expresión	
4.3. Funciones fisiológicas de la SOD3	
5. Superóxido dismutasa extracelular (SOD3) en cáncer	47
6. Exosomas y comunicación intercelular	48
6.1. Biogénesis y transporte	
6.2. Comunicación tumor-estroma	
OBJETIVOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Cepas de ratón	57
1.1. Ratones transgénicos FVB/N-Tg(MMTVneu) (Tg-neu)	
1.2. Ratones inmunodeficientes Rag2 ^{-/-}	
1.3. Ratones C57BL/6J salvajes (WT) y deficientes para SOD3 (SOD3 ^{-/-})	

2. Líneas celulares	58
3. Modelos tumorales y tratamientos	59
3.1. Modelo de tumores de mama espontáneos en los ratones Tg-neu	
3.2. Modelo de tumor singénico N202.1A en ratones Tg-neu y Rag2 ^{-/-}	
3.3. Modelo de tumor singénico LLC en ratones C57BL/6J y SOD3 ^{-/-}	
4. Muestras humanas	60
5. Plásmidos y construcciones virales	60
5.1. Generación de las partículas retrovirales de SOD3 y del mutante SOD3 ^{S195C}	
5.2. Generación de la construcción HASOD3	
6. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)	61
7. Análisis de expresión de ARNm mediante microarrays	62
8. Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA)	63
9. Análisis de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	64
10. Análisis de áreas hipóxicas en tumores	65
11. Análisis de la perfusión del tumor	65
12. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	66
13. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	66
14. Ensayos de permeabilidad	67
15. Cuantificación de doxorubicina	68
16. Detección del NO	68
17. Aislamiento de subpoblaciones celulares de tumor	69
18. Determinación del infiltrado leucocitario en tumores	69
19. Ensayos de adhesión y migración de leucocitos <i>in vitro</i>	70
20. Inmunoblot	71
21. Ensayos ELISA	72
22. Ensayos de ubiquitinación	72
23. Ensayos de promotor	73
24. Purificación de HA-SOD3	73
25. Ensayo de actividad enzimática SOD	74
26. Aislamiento y caracterización de exosomas	74
27. Espectrometría de masas. Proteómica cuantitativa <i>label free</i>	74
28. Análisis estadístico	75

RESULTADOS

1. Efecto del tratamiento con lovastatina sobre la vasculatura y el infiltrado en tumores de mama de ratones FVB/N-Tg (MMTVneu)	79
1.1. La lovastatina reduce la aparición de nuevas lesiones tumorales	
1.2. El tratamiento con lovastatina potencia la quimioterapia	
1.3. El tratamiento con lovastatina remodela la vasculatura y mejora la oxigenación tumoral	
1.4. El tratamiento con lovastatina aumenta el infiltrado de células T en el tumor	
1.5. La inhibición del crecimiento de tumores por lovastatina depende del sistema inmune adaptativo	
2. El tratamiento con lovastatina induce un programa genético que afecta a la angiogénesis y a la respuesta inflamatoria	87
2.1. La lovastatina inhibe la expresión del PIGF, un mediador de la polarización de los macrófagos en el tumor y la angiogénesis	
2.2. La lovastatina induce la expresión de la Superóxido Dismutasa 3 (SOD3) en el microambiente tumoral	
3. SOD3 contribuye a los efectos de la lovastatina sobre la vasculatura y sobre el infiltrado tumoral	95
3.1. Efecto sobre la quimioterapia	
3.2. Efecto sobre la estructura y permeabilidad de la red vascular tumoral	
3.3. Efecto sobre la infiltración de linfocitos T	
4. SOD3 regula la expresión de la VE-cadherina	99
4.1. La inducción de la SOD3 aumenta la acumulación de doxorrubicina en el tumor	
4.2. SOD3 regula la estructura de los vasos y aumenta la perfusión de los tumores	
4.3. SOD3 aumenta la transcripción de VEC en células endoteliales	
4.4. SOD3 aumenta los niveles de VEC de forma dependiente del óxido nítrico	
4.5. SOD3 reduce la permeabilidad de las células endoteliales	
4.6. Asociación de la SOD3 y la VEC en tumores humanos	
5. La inducción de la SOD3 aumenta la migración de linfocitos T e inhibe la actividad NF-κB	108
5.1. SOD3 regula diferencialmente la infiltración de linfocitos T y células mieloides <i>in vivo</i>	

5.2. La sobreexpresión de la SOD3 en células endoteliales potencia la adhesión y trans migración de linfocitos T	
5.3. SOD3 cambia el perfil de expresión génica en células endoteliales	
5.4. SOD3 previene la degradación de I κ B α	
5.5. La inhibición de NF- κ B en células endoteliales potencia la adhesión y trans migración de linfocitos T	
6. La inhibición de NF- κB por la SOD3 requiere de su secreción en exosomas	116
6.1. Expresión y purificación de la HA-SOD3	
6.2. Las células endoteliales endocitan la SOD3 exógena	
6.3. La SOD3 presente en el medio condicionado, pero no la forma purificada, inhibe la actividad de NF- κ B en células endoteliales	
6.4. SOD3 se secreta en exosomas	
6.5. La adición de la SOD3 en exosomas inhibe la activación de NF- κ B	
6.6. Estudio del interactoma de la SOD3	
DISCUSIÓN	127
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA	143
ANEXO	161

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico complementario
AJ:	Uniones adherentes (<i>Adherens junction</i>)
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
BSA:	Seroalbúmina Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAND1:	<i>Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1</i>
CCR:	Carcinoma colorectal
CTL:	Linfocito T citotóxico
DHE:	Dihidroetidio
DMEM:	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EC:	Célula endotelial (<i>Endothelial cell</i>)
ECM:	Matriz extracelular (<i>Extracellular matrix</i>)
EDTA:	Ácido etileno diamino tetra-acético
EFEMP1:	<i>EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1</i>
ELISA:	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK:	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
ESAM:	Molécula de adhesión celular específica (<i>Endothelial cell specific adhesion molecule</i>)
ESCRT:	Complejos de clasificación endosómica requeridos para el transporte (<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>)
FACS:	<i>Fluorescent-Activated Cell Sorting</i>
SFB:	Suero fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)
FDR:	Tasa de falsos positivos (<i>False discovery rate</i>)
FGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos (<i>Fibroblast growth factor</i>)
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein IsoTioCyanate</i>)
FPP:	Farnesilpirofosfato
GFP:	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescence protein</i>)
GGPP:	Geranil-geranilpirofosfato
GSEA:	Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>)
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
HA:	Hemaglutinina (<i>Hemagglutinin</i>)
HGF:	Factor de crecimiento de hepatocitos (<i>Hepatocyte growth factor</i>)

HMG CoA: Hidroxi-metil-glutaril coenzima A

i.p.: intraperitoneal

ICAM-I: Proteína de adhesión intercelular tipo I (*Intercellular adhesion molecule I*)

IFN: Interferón

IKK: Quinasa IκB (*IκB kinase*)

IL: Interleuquina

ILV: Vesículas intraluminales (*Intraluminal Vesicles*)

IκB: Inhibidor de kappa B (*Inhibitor of kappa B*)

JAM: Molécula de adhesión (*Junctional adhesion molecules*)

kDa: Kilodalton

L-NMMA: Inhibidor de la óxido nítrico sintasa NG-Monometil-L-Arginina (*Nitric Oxide Synthase Inhibitor NG-Monomethyl-L-Arginine*)

LFA: Antígeno asociado al linfocito (*Lymphocyte function-associated antigen*)

Lov: Lovastatina

LPS: Lipopolisacárido

LT: Linfotóxina

LUC: Luciferasa

MDSC: Células supresoras derivadas de mieloides (*Myeloid-derived suppressor cells*)

MMP: Metaloproteasas de la matriz

MMTV: Virus de ratón de tumores mamarios

MT: Microambiente tumoral

MVB: Cuerpos multivesiculares (*Multivesicular bodies*)

NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NK: Células asesinas naturales (*Natural killer*)

NO: Óxido nítrico (*Nitric oxide*)

NOS: Óxido nítrico sintasa (*Nitric oxide synthases*)

NPY: Neuropeptido Y

O₂⁻: Anión superóxido

OH: Radical hidroxilo

PBS: Solución salina tamponada con fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet-derived growth factor*)

PECAM1: Molécula de adhesión a células endoteliales y plaquetas (*Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule*)

PFA: Paraformaldehído

PIGF: Factor de crecimiento placentario (*Placental growth factor*)

PTP: Proteínas tirosin-fosfatasas

PV1: Vesícula del plasmalema 1 (*Plasmalemma vesicle 1*)

PVR: Receptor de poliovirus (*Poliovirus receptor*)

RAG-2: Gen activador de los reordenamientos 2

RNS: Especies reactivas del nitrógeno (*Reactive nitrogen species*)

ROS: Especies reactivas del oxígeno (*Reactive oxygen species*)

RPMI: Medio de cultivo desarrollado en Roswell Park Memorial Institute (*Roswell Park Memorial Institute medium*)

Rq: Cantidad relativa (*Relative Quantity*)

RT-PCR: Reacción de transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)

RTK: Receptores tirosin-quinasa

SEM: Microscopia electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*)

SOD3: Superóxido dismutasa 3

TAMs: Macrófagos asociados a tumores (*Tumor-associated macrophages*)

TDSF: Factores supresores derivados del tumor (*Tumor-Derived Suppressor Factor*)

Tg-MMTVneu: Ratón Transgénico MMTVneu

TGF: Factor de crecimiento transformante (*Transforming growth factor*)

Th1: Célula T cooperadora de tipo 1 (*type 1 T helper cell*)

Th2: Célula T cooperadora de tipo 2 (*type 2 T helper cell*)

TILs: Linfocitos infiltrantes en tumores (*Tumor-infiltrating lymphocytes*)

TJ: Uniones estrechas (*Tight junction*)

TLR: Receptor tipo toll (*Toll-like receptor*)

TNF: Factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor*)

Treg: Célula T reguladora (*T regulatory cell*)

UA: Unidades Arbitrarias

VCAM-I: Proteína de adhesión celular vascular de tipo 1 (*Vascular cell adhesion protein 1*)

VEC: Cadherina del endotelio vascular (*Vascular endothelial cadherin*)

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

Vhcl: Solvente (*Vehicle*)

VLA: Antígeno tardío (*Very late antigen*)

VSMC: Células del músculo liso vascular (*Vascular smooth muscle cells*)

WT: Silvestre, no modificado genéticamente (*Wild Type*)

RESUMEN

La progresión tumoral induce la formación de nuevos vasos sanguíneos que son aberrantes e hiperpermeables. Estos vasos reducen la perfusión tumoral y la llegada de quimioterapéuticos, además de alterar la diapédesis de los leucocitos hacia el tumor. Este proceso de anormalización es reversible, al menos durante una ventana temporal. La normalización de la vasculatura tumoral ha mostrado ser una estrategia en la clínica para aumentar la eficacia de las terapias antitumorales. Nuestra hipótesis es que la anormalización vascular en los tumores puede deberse a la exposición de los vasos sanguíneos a la inflamación crónica característica del microambiente tumoral.

En este trabajo utilizamos como agente anti-inflamatorio la estatina natural lovastatina (Lov), un inhibidor de la biosíntesis de colesterol, en varios modelos tumorales de ratón. El tratamiento con Lov indujo la normalización de los vasos sanguíneos, reflejándose en una mejora de la eficiencia de la quimioterapia y un aumento en la infiltración selectiva de linfocitos T. Mediante la búsqueda de dianas moleculares mediadoras de estos efectos, identificamos a la superóxido dismutasa extracelular (SOD3), la principal enzima antioxidante del espacio extracelular, cuya expresión se encuentra disminuida en algunos tumores. El tratamiento con Lov induce la expresión de la SOD3 en el microambiente tumoral, y esto aumenta la eficiencia de la quimioterapia, reduce la permeabilidad vascular y potencia de forma específica la migración de las células T CD3⁺. La reducción de la permeabilidad mediada por la SOD3 es dependiente de su actividad enzimática y del aumento de la biodisponibilidad del NO cerca de los vasos, siendo este NO el que induce la expresión de la cadherina del endotelio vascular (VEC). El efecto de la SOD3 sobre la migración diferencial de linfocitos implica la inhibición de la actividad del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (NF-κB). SOD3 atenúa la actividad NF-κB en las células endoteliales al reducir la degradación de su inhibidor IκBα, lo que disminuye la localización nuclear de NF-κB y su actividad transcripcional. Un hallazgo sorprendente es que la inhibición de la actividad NF-κB inducida por la SOD3 requiere la secreción de SOD3 en exosomas y su internalización en las células endoteliales de forma paracrina/autocrina.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la SOD3 es una enzima que regula la función endotelial en tumores siendo una posible diana terapéutica a través de la cual se podría modificar la composición del estroma con el fin de mejorar tanto la quimioterapia como la inmunoterapia.

ABSTRACT

Tumour progression induces the formation of new blood vessels that are aberrant and hyperpermeable. This abnormalization reduces tumour perfusion as well as delivery of chemotherapeutics, and hinders leukocyte diapedesis; this state is nonetheless at least temporarily reversible. Normalization of the vasculature is a clinical strategy that can improve anti-tumour therapies. We hypothesize that the abnormal vascularization of tumours is due to exposure of these vessels to the chronic inflammation that characterizes the tumour microenvironment.

In this study, we used lovastatin (Lov), a natural statin that inhibits cholesterol biosynthesis via the mevalonate pathway, given its anti-inflammatory activity in various murine tumour models. Lov treatment induced blood vessel normalization, which was reflected as improved chemotherapeutic effectiveness and a specific increase in T lymphocyte infiltration. By searching for molecular targets that mediate these effects, we identified extracellular superoxide dismutase (SOD3), the principal antioxidant enzyme in the extracellular space and whose expression is reduced in some tumors. Lov treatment induces SOD3 expression in the tumor microenvironment, which increases chemotherapy efficiency, reduces vascular permeability, and specifically potentiates CD3⁺ T cell migration. The reduction in SOD3-mediated permeability depends on its enzyme activity and increased bioavailability of nitric oxide near the vessels, which induces expression of vascular endothelial cadherin (VEC). The SOD3 effect on differential lymphocyte migration involves inhibition of NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). SOD3 attenuates NF- κ B activity in endothelial cells by reducing the degradation of its inhibitor I κ B α , which decreases the nuclear localization of NF- κ B as well as its transcriptional activity. An unanticipated finding was that inhibition of SOD3-induced NF- κ B activity requires SOD3 secretion into exosomes and its paracrine/autocrine internalization in endothelial cells.

In summary, our results suggest that the enzyme SOD3 regulates endothelial function in tumors and is a potential therapeutic target through which stroma function and composition could be modified to improve both chemo- and immunotherapy.

INTRODUCCIÓN

El microambiente tumoral (MT) es el producto de una red de comunicación entre componentes celulares y no celulares que determinan las características típicas de los tumores sólidos. Estos componentes incluyen principalmente las propias células tumorales, células endoteliales, fibroblastos, células del sistema inmune, además de componentes de la matriz extracelular (Nyberg, 2008). Las condiciones dentro del MT son diferentes a las de un tejido normal y se caracterizan por presentar hipoxia, bajo pH y bajos niveles de glucosa. El MT juega un papel crítico en la evolución de las neoplasias, ya que la progresión o inhibición del crecimiento tumoral está íntimamente ligada a la integración de las señales liberadas por dicho microambiente (Wang et al., 2017). Por lo tanto, los elementos del MT que promueven el desarrollo tumoral serían dianas terapéuticas mediante las cuales se podría inhibir la progresión de las neoplasias (Witz, 2006). Este es el caso de la respuesta inflamatoria y la angiogénesis, para las cuales existen fármacos que se han mostrado eficaces en tumores sólidos.

El interés de este trabajo se centra en estudiar las estrategias para modificar las características de la vasculatura tumoral y su repercusión en mejorar la quimioterapia así como modificar la respuesta inflamatoria hacia un fenotipo anti-tumoral.

1. La reacción inflamatoria en el cáncer

La inflamación es la principal respuesta de defensa del organismo frente a la infección (microbiana o viral) que se activa como consecuencia de la muerte celular. Esta respuesta se desencadena con el fin de estimular la regeneración de los tejidos lesionados y combatir los patógenos. Sin embargo, la inflamación crónica puede iniciar o promover diversas patologías, como la fibrosis, la metaplasia y el cáncer. Hasta un 25% de los cánceres están relacionados con la inflamación (Shrihari, 2017). La gran mayoría de los tumores se caracterizan por generar un MT inflamatorio, incluso si el desarrollo del tumor no es consecuencia de una inflamación crónica (Grivennikov et al., 2010). La infiltración de células inmunes en el tumor puede tanto desencadenar una respuesta anti-tumoral como promover activamente la tumorigénesis, dependiendo de la composición y la polarización de las células inmunes reclutadas (Shalapour and Karin, 2015). De manera que la presencia de determinadas células inmunes (linfocitos T CD8⁺, NK y NKT) se ha asociado con un buen pronóstico en algunos tumores humanos (Assaf et al., 2014; Telma et al., 2012). Por el contrario, la infiltración masiva de células de origen mieloide, como células mieloides supresoras (MDSCs) y macrófagos asociados al tumor (TAMs), o de células T reguladoras (Tregs) se correlaciona con estadios avanzados y con la progresión de la enfermedad para diversos tipos de tumores (Draghiciu et al., 2015; Liu et al., 2015c; Sato et al., 2005).

Burnet y Thomas establecieron la teoría de la inmunovigilancia del cáncer, proceso por el cual tanto las células innatas como las adaptativas reconocen los antígenos asociados a tumores desencadenando así su eliminación (Burnet, 1970). Posteriormente, Dunn y Schreiber desarrollaron el concepto de inmunoección del cáncer, el cual está compuesto por tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Dunn et al., 2002). En primer lugar, las células inmunes efectoras, tales como las células NK eliminan las células transformadas iniciales. Esta eliminación da como resultado una selección de variantes tumorales que tienen baja inmunogenicidad y que son resistentes a las células inmunes efectoras, alcanzando así la fase de equilibrio. Finalmente, cuando el tamaño del tumor es detectado mediante diagnóstico por imagen, los factores solubles derivados del tumor (TDSFs) inducen mecanismos de escape inmunológico (Kim et al., 2006). Conforme evoluciona el tumor, la constante interacción entre los componentes inmunes y del MT conduce a una modificación en la composición del infiltrado que soporta –en lugar de inhibir– el crecimiento tumoral (Cimino-Mathews et al., 2015).

1.1. Infiltrado inflamatorio: composición e implicaciones

En la mayoría de los tumores, la inmunovigilancia está funcionalmente representada por la presencia de linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) en la masa celular neoplásica. De hecho, la transferencia adoptiva de TILs puede restringir el crecimiento tumoral eficazmente (Turcotte et al., 2013). Los TILs que se identifican en las biopsias se componen principalmente de células T CD4⁺ colaboradoras (o *helper*, Th), células T CD8⁺ citotóxicas (CTL), y células T reguladoras (Treg, CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺). Generalmente, las células T citotóxicas CD8⁺ (CTL) y las células T colaboradoras CD4⁺ (Th)1 previenen el desarrollo del cáncer a través de mecanismos que involucran la producción de interferón IFN-γ y citotoxinas (Zamarron y Chen, 2011). Las células Treg, por el contrario, suprimen las funciones de algunas células inmunitarias liberando citoquinas que inhiben la activación o suprimen la actividad efectora de las células T CD4⁺ y CD8⁺. En algunos tumores las Tregs también potencian la función anti-tumoral de las células NK mediante el aumento en la producción del ligando Fas y de perforina (Bergmann et al., 2011).

Los macrófagos son un componente esencial de la inmunidad innata en seres humanos, que pueden representar hasta el 50% de la masa tumoral, y se les denomina macrófagos asociados a tumores (TAM). Los TAM promueven la proliferación de células cancerosas, estimulan la angiogénesis tumoral y la descomposición de la matriz extracelular, suprimen la respuesta inmunitaria anti-tumoral y potencian la invasión tumoral y la metástasis (Qian y Pollard, 2010). Los TAMs pueden presentar un fenotipo M1 o macrófago clasicamente activado o bien M2 o macrófago alternativamente activado (Davies et al., 2013).

Los macrófagos M1 participan en la respuesta inflamatoria, eliminación de patógenos e inmunidad antitumoral (Chanmee et al., 2014). Por el contrario, los macrófagos M2 están asociados con un mal pronóstico en muchos tipos de cáncer ya que pueden promover la progresión del ciclo celular e inhibir la apoptosis (Pollard, 2004). A medida que el tumor evoluciona, los diferentes factores que se generan en el MT hacen que los TAM cambien su estado de diferenciación de M1 a M2, el cual promueve la progresión tumoral (Chanmee et al., 2014).

En el estroma del tumor, no sólo se han encontrado células inmunitarias completamente diferenciadas, sino que también se han identificado una gran variedad de células progenitoras mieloides parcialmente diferenciadas (Murdoch et al., 2008). Estas células mieloides infiltrantes de tumores (MDSCs) coexpresan el marcador de macrófagos CD11b y el marcador de neutrófilos Gr1, cuya función es la de suprimir la actividad de los CTL y de células NK (Qian and Pollard, 2010; Ostrand-Rosenberg y Sinha, 2009). Además las MDSCs favorecen la proliferación celular, la angiogénesis por activación de STAT-3, la invasión a través de las metaloproteasas de matriz (MMP) que degradan la matriz y la transición epitelio-mesénquima mediada por la secreción del TGF- β (factor de crecimiento transformante, beta), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) y FGF (factor de crecimiento fibroblástico) (Katoh y Watanabe, 2015; Shrihari, 2016).

1.2. Tráfico de leucocitos en el tumor

Una de las etapas que condiciona la respuesta inflamatoria frente a un tumor es la extravasación de leucocitos desde el torrente sanguíneo (Sánchez-Madrid y del Pozo, 1999). Esta extravasación es un proceso que requiere de la actividad coordinada de moléculas de señalización como las quimioquinas y de moléculas de adhesión, así como de componentes del citoesqueleto (Vicente-Manzanares y Sánchez-Madrid, 2004).

Las quimioquinas son proteínas de la familia de las citoquinas de bajo peso molecular cuya función principal es el reclutamiento de leucocitos específicos al sitio del tumor. Estas quimioquinas regulan la adhesión de los leucocitos al endotelio (Oelkrug y Ramage, 2014) y colaboran en su activación (Murphy et al., 2008). En algunos tumores, se induce la expresión de ciertas quimioquinas que regulan la respuesta inmune en beneficio del crecimiento tumoral. Un ejemplo es la quimioquina CCL22 en cáncer de mama y ovario, la cual es responsable de la acumulación de células Tregs en el tumor generando un microambiente de supresión de la respuesta inmune (Curiel et al., 2004). Sin embargo, también se puede crear un ambiente de quimioquinas que favorecen la respuesta inmune anti-tumoral.

En este sentido, es interesante destacar el caso de la quimioquina CXCL16, cuya inducción en cáncer colorectal se ha asociado con la infiltración de células T CD4⁺ y CD8⁺, resultando en un aumento en la supervivencia (Hojo et al., 2007). Además, algunas quimioquinas tienen doble función en la regulación de la respuesta inmune. Este es el caso de CCL2, cuya sobreexpresión se asocia con un buen pronóstico, ya que suprime la formación de tumores mediante el aumento de la infiltración de células efectoras en modelos animales (Lanca et al., 2013; Rollins and Sunday, 1991) y en cánceres humanos (Kehlen et al., 2014; Peña et al., 2015). Mientras que en otros tipos de cánceres se asocia con mal pronóstico ya que está directamente relacionada con la respuesta inmunosupresora generada por las MDSCs y los TAM (Izumi et al., 2013, Li et al., 2013, Schmall et al., 2015; Stewart et al., 2009). Por lo tanto, las quimioquinas expresadas en el MT van a dictar el tipo de células inmunes que infiltran el tumor, determinando la evolución del mismo.

En este ambiente inflamatorio las células endoteliales de la microvasculatura se activan. Esta activación permite a los leucocitos circulantes reconocer el endotelio vascular de los tejidos inflamados e interactuar con la pared de los vasos sanguíneos a través de una serie de pasos conocidos como captura, rodamiento, anclaje, adhesión y migración transendotelial (Vestweber, 2015) (**FIG. 1**). El primer paso es la interacción entre el leucocito y la célula endotelial a través de las selectinas del endotelio (tanto la P- como la E-selectina) y del leucocito (L-selectina) que permiten el rodamiento por la superficie del endotelio inflamado (McEver, 2015). Este rodamiento hace que el leucocito se aproxime a la célula endotelial permitiendo la unión de ciertos quimioatrayentes presentados por el endotelio, tales como C5a, a sus receptores específicos en los leucocitos (Alon y Feigelson, 2012). Esta unión estimula la señalización que activa a las integrinas y provoca la adhesión firme de los leucocitos a través de sus ligandos expresados por las células endoteliales. Las principales integrinas implicadas en esta adhesión son $\alpha\text{L}\beta 2$ (LFA1, *lymphocyte function associated antigen 1*) y $\alpha 4\beta 1$ (VLA4, *very late antigen 4*), y sus ligandos ICAM1 (*intercellular adhesion molecule 1*) y VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), respectivamente (van Buul, 2007). Una vez que se establecen estas interacciones, el leucocito se detiene y atraviesa la barrera endotelial para su migración transendotelial. Esta migración ocurre generalmente entre dos células endoteliales (diapédesis paracelular) cuya separación está mediada por señales inducidas por el leucocito, pero también puede ocurrir atravesando directamente la propia célula endotelial (diapédesis transcelular) (Vestweber, 2015). En ambos procesos de diapédesis intervienen moléculas y receptores de adhesión tales como PECAM1 (*platelet endotelial cell adhesion molecule 1*) (Muller, 1995), JAMs (*junctional adhesion molecules*) (Nourshargh et al., 2006), ESAM (*endotelial cell-selective adhesion molecule*) (Wegmann, et al., 2006), CD99 (Schenkel et al., 2002), PVR (*poliovirus receptor*)

(Reymond et al., 2004) y otros. Algunas moléculas son exclusivas de la vía paracelular, como es el caso de la cadherina del endotelio vascular (VEC, cadherina 5 o CD144), actuando como una barrera para la trans migración (Schulte *et al.*, 2011). Mientras que la proteína PV1 (*plasmalemma vesicle 1*) parece ser exclusiva de la vía transcelular (Stan et al., 2004).

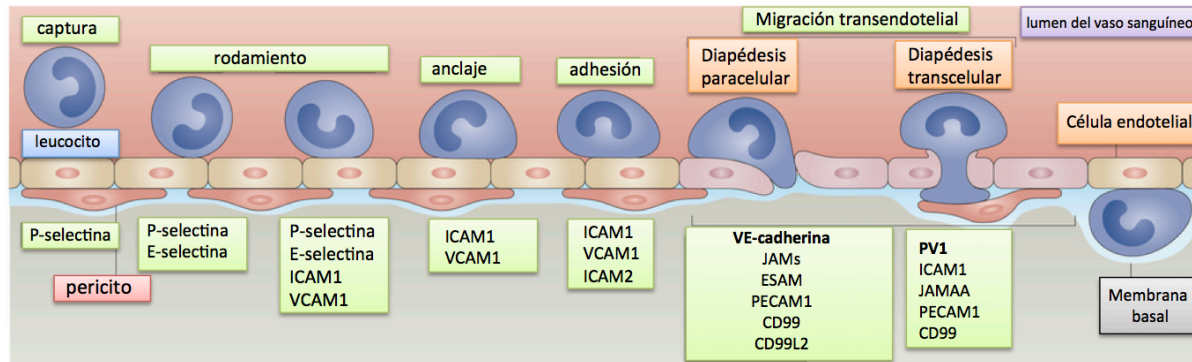


Figura 1. Proceso de extravasación de leucocitos. Representación de las principales etapas en la extravasación de leucocitos, así como de las principales moléculas que participan en el anclaje, rodamiento, activación, adhesión y trans migración de los leucocitos desde el lumen del vaso sanguíneo hacia el tejido. Figura adaptada de Vestweber, 2015.

2. Angiogénesis tumoral

Los vasos sanguíneos distribuyen oxígeno y nutrientes a todas las partes del cuerpo, eliminan los productos de desecho y proporcionan un sistema de transporte para las células del sistema inmune (Carmeliet y Jain, 2011). Los tumores sólidos secretan factores que estimulan la formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes, proceso que se conoce como angiogénesis, una etapa esencial para el crecimiento tumoral (Carmeliet y Jain, 2000; Verheul et al., 2004; Jain, 2001).

2.1. Características estructurales y funcionales de la vasculatura tumoral

Los vasos sanguíneos que irrigan el tumor, al igual que los de los tejidos sanos, están formados por células endoteliales (EC), células murales (o pericitos) y membrana basal. Sin embargo, se diferencian de los vasos sanguíneos normales en su estructura, ya que son variables en tamaño, forma y patrón de ramificación y en su función (Baluk, 2005). El tumor genera un desequilibrio en factores pro- y anti-angiogénicos que inducen la migración y proliferación de células endoteliales. El exceso de células endoteliales y células perivasculares anómalas contribuye a la formación de vasos tortuosos, dilatados y saculares que están mal organizados y son hiperpermeables (Baish et al., 2000). Los vasos tumorales, además, carecen de uniones fuertes en la monocapa de células endoteliales, esencial para

la función barrera. La débil unión entre las EC en tumores causa aperturas en los vasos y una pérdida de permeabilidad selectiva (Hashizume et al., 2000). En condiciones normales, la presión del líquido dentro de los vasos sanguíneos es mayor que en el tejido circundante. Sin embargo, en tumores sólidos, debido a la filtración de los vasos, el fluido que se escapa a través de ellos genera hinchazón (edema) y aumenta la presión en los tejidos (Jain, 1988; Boucher y Jain, 1992).

El resultado neto es una red vascular caótica y heterogénea de vasos hiperpermeables generando un microambiente tumoral caracterizado por: i) hipertensión, debido a la elevada presión del fluido intersticial (Heldin et al., 2004), ii) hipoxia, debido a la baja perfusión de los vasos sanguíneos y iii) bajo pH, debido al metabolismo anaeróbico. Estas características patofisiológicas de los tumores sólidos incrementan la resistencia al flujo sanguíneo y afectan al suministro de sangre, así como a la entrega y efectividad de las terapias citotóxicas convencionales y/o a la función de las células inmunitarias (Jain, 1988; Padera et al., 2004; Hamzah, J. et 2008) (**FIG. 2A, B**).

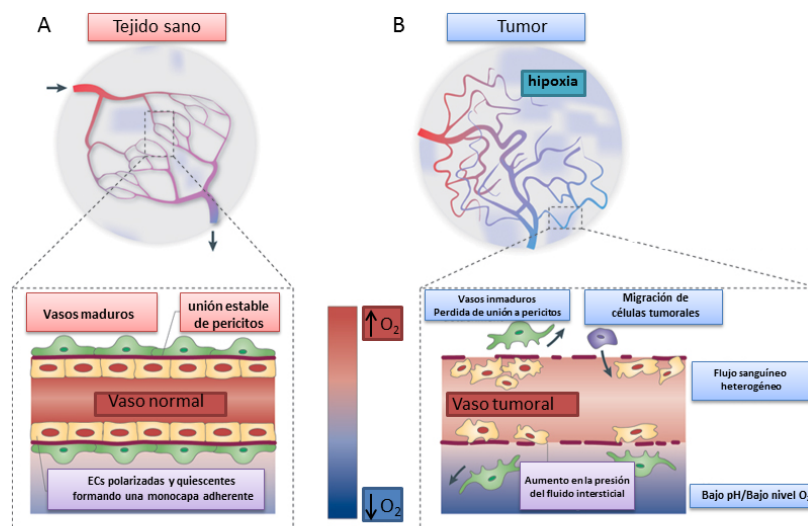


Figura 2. Diferencias entre los vasos sanguíneos en tejidos sanos y en tumores. A) En el tejido sano, la unión entre las ECs es estable, manteniendo firme unión a los pericitos, formando una barrera endotelial funcional. B) En el tumor hay pérdida de unión entre ECs, así como a los pericitos, perdiéndose la integridad de la vasculatura. Figura adaptada de Carmeliet y Jain, 2011.

2.2. Efectos de la normalización de la vasculatura tumoral sobre la quimioterapia e inmunoterapia del cáncer

A principios del año 1971 se postuló la idea del uso de la terapia anti-angiogénica como tratamiento del cáncer (Folkman, 1971). Posteriormente se puso en práctica en la clínica mediante el uso de los inhibidores de VEGF, que son los fármacos anti-angiogénicos más utilizados. Estos fármacos inhiben la angiogénesis tumoral y alteran el estado inmunológico en el microambiente tumoral. Especialmente afectan a la relación y características de las células T reguladoras (Tregs) (Bruno et al., 2014; Samples et al.,

2013), disminuyendo el número de células y aliviando la inmunosupresión asociada al tumor. Sin embargo, el tratamiento prolongado con terapias anti-angiogénicas puede destruir la mayoría de los vasos y, en paralelo, los tumores pueden adquirir vías alternativas de angiogénesis en respuesta a la hipoxia que se genera (Carmeliet y Jain, 2000). Además disminuyen el suministro sanguíneo del tumor, reduciendo así la efectividad de la radioterapia y quimioterapia (Jain, 2005). Por ejemplo, en los tumores sólidos, la hipoxia induce resistencia al tratamiento con quimioterapéuticos como la doxorubicina (Sullivan, 2008; Frederiksen, 2003). El acceso y la función de las células inmunitarias antitumorales también se reducen con el tratamiento anti-angiogénico.

La normalización vascular fue inicialmente identificada como el proceso de remodelación vascular en xenoinjertos de células tumorales humanas en ratón, donde se demostró que la terapia citotóxica aplicada durante el periodo de normalización vascular tenía mejor resultado (Winkler et al., 2004). Este proceso se caracteriza por una reducción en el diámetro de los vasos sanguíneos, en la permeabilidad y en la presión del fluido intersticial. Una de las consecuencias de esta normalización es el aumento del reclutamiento de pericitos que conlleva un incremento en la maduración de los vasos; en último término esto causa un aumento en la perfusión vascular y en la oxigenación del tumor (Jain et al., 2007; Crawford y Ferrara, 2009; Izumi et al., 2002; Jain, R. K. et al., 1998; Carmeliet, 2005).

El bloqueo de VEGF normaliza la vasculatura lo que mejora la eficacia de la quimioterapia, aumentando la liberación de fármacos citotóxicos, y de la inmunoterapia potenciando el reclutamiento de células inmunitarias (Shrimali et al., 2010). Esto sugiere que si se corrigiera la estructura y función de los vasos, se podría normalizar el microambiente tumoral para la mejora de las terapias antitumorales convencionales (Jain, 2001). Por ejemplo, en el tratamiento de glioma ortotópico en ratón, el uso de DC101, un anticuerpo monoclonal para VEGFR2, generó cambios en la estructura de la vasculatura, aumentando la oxigenación del tumor. Este aumento en la oxigenación durante la normalización temporal potenció la respuesta del tumor a la radioterapia (Winkler, 2004). La respuesta a la quimioterapia también se ve mejorada tras la normalización vascular, ya que las células tumorales son más sensibles a los fármacos citotóxicos debido a la elevada tasa de proliferación (Willett, C.G. et al., 2004).

Numerosos estudios también implican al factor del crecimiento placentario (PlGF), miembro de la familia VEGF, en la inducción de vasos tumorales aberrantes. A diferencia del VEGF, el PlGF induce selectivamente la angiogénesis asociada a enfermedades, siendo prescindible en la angiogénesis fisiológica (Fischer et al., 2008). La reducción de los niveles de PlGF en el tumor induce la maduración de los vasos sanguíneos, reduce la permeabilidad, aumenta la oxigenación del tumor y la respuesta a la quimioterapia, además

de inducir la polarización de los TAMs hacia un fenotipo M1 (Rolny et al., 2011). Por lo tanto, el bloqueo de PIGF también induce la normalización de la red vascular.

Estos datos indican que la normalización de la vasculatura se limita a una ventana transitoria, siendo interesante investigar cómo prolongar esta “ventana de normalización” para aumentar la eficacia de la quimioterapia (Carmeliet y Jain, 2000).

2.3. Papel de la VE-cadherina (VEC) en la función barrera del endotelio tumoral

Desde una perspectiva molecular, la función barrera endotelial se basa en varios sistemas de adhesión célula-célula entre las EC, incluyendo las uniones adherentes (AJ) y las uniones estrechas (TJ), cuyo control es esencial para la homeostasis vascular (Giannotta et al., 2013). La VEC es responsable del ensamblaje de las uniones adherentes endoteliales y de la arquitectura de la barrera endotelial (Giannotta et al., 2013). Ésta es una proteína transmembrana que interacciona homotípicamente con otra VEC de una célula adyacente a través de su dominio extracelular. La región intracelular de la VEC interactúa con proteínas citoplasmáticas tales como β -catenina y p120-catenina, las cuales anclan la VEC al citoesqueleto de actina y controlan las señales generadas por esta molécula. Estas señales incluyen la modulación de la respuesta de las EC a factores angiogénicos, señales de quiescencia y polaridad, así como la interacción de las EC con células murales (Giannotta et al., 2013). Además, los cambios en la función, localización o expresión de la VEC desestabilizan gravemente la vasculatura en embriones y adultos (Gory-Fauré et al., 1999; Crosby et al., 2005).

La expresión de la VEC en el endotelio se asocia normalmente a un estado anti-proliferativo de las células, como consecuencia en parte de la reducida actividad del receptor 2 de VEGF (Giannotta et al., 2013). Sin embargo, la VEC también aparece en el endotelio del tumor pero sufre algunas modificaciones. El ambiente hipóxico de un tumor y los bajos niveles de óxido nítrico (NO) aumentan la permeabilidad vascular mediante la degradación de la β -catenina (Lai et al., 2011). Además se liberan metaloproteasas que degradan el dominio extracelular de la VEC, perdiéndose la interacción homotípica en la célula adyacente. Esto tiene como consecuencia la pérdida de permeabilidad selectiva, y el aumento en la extravasación celular. Además, en tumores sólidos el incremento en la cantidad del factor de necrosis tumoral (TNF α) y VEGF dan lugar a la fosforilación de residuos tirosina o serina de la VEC que induce su internalización, redistribución o su degradación (Giannotta et al., 2013; Wessel et al., 2014).

2.4. Activación de NF- κ B en las células endoteliales

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (NF- κ B) es uno de los reguladores principales de la respuesta inflamatoria. Además controla un amplio espectro de efectos biológicos como la angiogénesis, la proliferación, la apoptosis, la diferenciación celular y la tumorigénesis (Rahman y Fazal, 2011; Karin y Greten, 2005). La familia de NF- κ B en mamíferos consiste en cinco proteínas, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1), y p100/52 (NF- κ B2), las cuales comparten un dominio de homología Rel por el que se asocian unas a otras formando homo- y heterodímeros; la formación de dichos dímeros es necesaria para su actividad transcripcional (Oeckinghaus y Ghosh, 2009).

En condiciones basales, los dímeros de NF- κ B están unidos a los inhibidores I κ B, que secuestran a NF- κ B en el citoplasma impidiendo su localización en el núcleo. En presencia de estímulos que activan a NF- κ B, se inicia la fosforilación de las proteínas I κ B por el complejo quinasa de I κ B (IKK). Este complejo consiste en dos quinasas catalíticamente activas, IKK α e IKK β , y la subunidad reguladora IKK γ (NEMO). La fosforilación de I κ B es una señal para la ubiquitinación mediada por los complejos E3 ubiquitina ligasa y su consecuente degradación por el proteosoma 26S. De esta manera se liberan los dímeros de NF- κ B para su localización en el núcleo (De Martin et al., 2000).

Existen dos vías principales de activación de NF- κ B, conocidas como canónica y no canónica. La vía canónica es inducida por los siguientes receptores: receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), receptor de interleucina 1 (IL-1R), receptores de antígeno y de reconocimiento de patrones, incluyendo el receptor *Toll-like receptor 4* (TLR4). Esta vía se define como dependiente de IKK β y NEMO que median la fosforilación de I κ B α , desencadenándose así su poli-ubiquitinación y degradación vía proteosoma. Esto permite la localización nuclear de la mayoría de los heterodímeros que contienen a p65. La vía no canónica es inducida por ciertas citoquinas de la familia de TNF, como la linfotoxina- β (LT β), el factor de activación de células B (BAFF), CD40L, y LPS. Esta vía implica la fosforilación mediada por IKK α de p100 asociada a RelB, lo que conduce a la poli-ubiquitinación y al procesamiento parcial de p100. Este proceso da lugar a la generación de complejos p52-RelB transcripcionalmente activos (Pomerantz y Baltimore 2002) (FIG. 3).

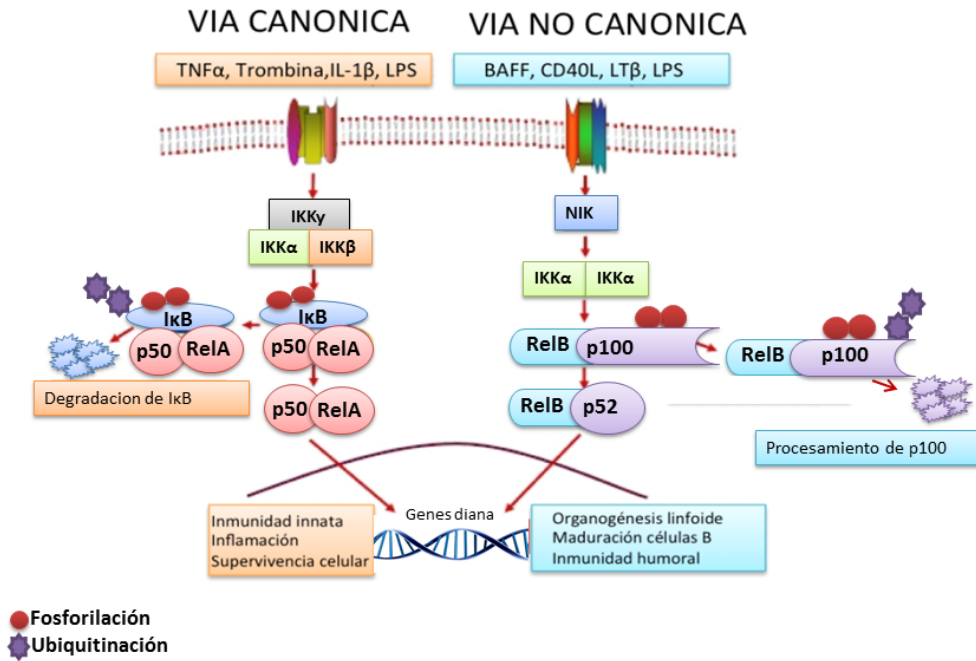


Figura 3. Activación de la señalización de NF- κ B a través de las vías canónica y no canónica. En ambos casos, la activación de NF- κ B mediante las diferentes citoquinas y moléculas asociadas a patógeno se traduce en su entrada al núcleo y la activación de los genes diana. La vía canónica es activa en la inmunidad innata, inflamación y la supervivencia celular; mientras que la vía no canónica media la inmunidad humoral.

NF- κ B se activa constitutivamente en la mayoría de los cánceres, tanto en las células tumorales como en las células del microambiente tumoral (Karin y Greten, 2005). Su activación en las células tumorales induce la expresión de los genes que participan en la supervivencia celular y proliferación, mientras que en las células del estroma activa la expresión de citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento (Grivennikov et al., 2010; Karin y Greten, 2005). En el endotelio, NF- κ B está implicada en una serie de funciones como es la remodelación de la microvasculatura, ya que induce la expresión de moléculas de adhesión y aumenta la permeabilidad de los vasos (Rahman y Fazal, 2011).

Además, NF- κ B juega un papel fundamental en el reclutamiento de leucocitos circulantes a los sitios inflamados a través del control de un programa transcripcional proinflamatorio específico, pues induce la expresión de moléculas de adhesión (P- y E-selectina, ICAM-1, VCAM-1), citoquinas pro-inflamatorias ($IL-1$, $IL-6$, $TNF\alpha$, etc) y quimioquinas (CCL2, CCL7, etc) (Cines et al., 1998).

3. Las estatinas como agentes anti-inflamatorios y anti-tumorales

Las estatinas son una familia de compuestos que inhiben la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa. Esta enzima cataliza la reacción de conversión de acetil-CoA en ácido mevalónico en la vía de biosíntesis de colesterol. La principal aplicación clínica de las estatinas es la reducción de los niveles de colesterol en sangre (Bronner et al., 1995).

Las estatinas se clasifican en base a sus propiedades hidrofílicas/lipofílicas. Las estatinas hidrofílicas (pravastatina y rosuvastatina) no son capaces de penetrar la bicapa lipídica de las membranas celulares. Sin embargo, las estatinas lipofílicas (lovastatina, sinvastatina, atorvastatina y fluvastatina) pueden directamente atravesar las membranas celulares y, además de disminuir el colesterol en el hígado, pueden ejercer efectos pleiotrópicos en tejidos extrahepáticos (Ichihara y Satoh, 2002).

Al inhibir la síntesis de colesterol, las estatinas también previenen la formación de los intermediarios isoprenoides farnesilpírofosfato (FPP) y geranilgeranilpírofosfato (GGPP) (Brown y Goldstein, 1990). Estos isoprenoides están involucrados en la modificación postraducciona de numerosas proteínas de señalización, como pequeñas proteínas G heterotriméricas, lamina A nuclear y las GTPasas Ras, Rho, Rab, Ral y Rap, permitiendo su correcta localización subcelular y tráfico intracelular (Cordle et al., 2005; Greenwood, et al., 2006). Estas proteínas son responsables de numerosas funciones celulares como la remodelación del citoesqueleto, la endocitosis, la adhesión celular, la motilidad y la expresión génica, por lo que las estatinas podrían afectar a numerosos procesos independientemente de la regulación de los niveles de colesterol plasmático.

Aunque son usadas en el tratamiento de la hipercolesterolemia y la prevención de enfermedades coronarias (Safwat et al., 2017), existen análisis preclínicos donde se usan las estatinas en el tratamiento de numerosas enfermedades como colitis inflamatoria, enfermedad renal crónica (Honore et al., 2016; Kimura et al., 2016), leucemia linfocítica crónica (Benakanakere et al., 2014), esclerosis múltiple, artritis reumatoide (McCarey et al., 2004), en la enfermedad de reacción de injerto contra huésped (Broady y Levings, 2008), en síndromes de envejecimiento prematuro (Varela et al., 2008), así como en el tratamiento del cáncer (Demierre et al., 2005). Los efectos beneficios de las estatinas en estas enfermedades son el resultado de su actividad anti-inflamatoria y/o inmunomoduladora en tejidos extrahepáticos (Mira y Mañes, 2009).

3.1. Efectos anti-inflamatorios de las estatinas

Uno de los efectos pleiotrópicos de las estatinas es la atenuación de la respuesta inflamatoria al disminuir las propiedades inflamatorias de los leucocitos circulantes y la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión en las células endoteliales. Los efectos anti-inflamatorios de las estatinas también están relacionados principalmente con la inducción de la expresión de eNOS (Dulak y Józkwicz, 2005). En este sentido, uno de los mecanismos por los que las estatinas inhiben la interacción entre los leucocitos y las células endoteliales es a través de la reducción en la expresión de las selectinas P y E en las células endoteliales, mediada por la inhibición en la liberación de NO y de la vía de NF- κ B, respectivamente (Yoshida et al., 2001) (Stalker et al., 2001; Prasad et al., 2005). Algunas estatinas también inhiben la expresión de LFA-1 e ICAM-1 (Niwa et al., 1996), y de VLA-4 (Yoshida et al., 2001) en monocitos reduciendo su interacción con las células endoteliales. Las estatinas también afectan a la extravasación de leucocitos a través de la regulación de la expresión de las quimioquinas. Esta regulación se lleva a cabo mediante la inhibición de la vía de NF- κ B (Greenwood y Mason, 2007). Se ha descrito que el tratamiento con estatinas disminuye los niveles de CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10 y CXCL16 en las células endoteliales, responsables de la quimiotaxis de linfocitos T, monocitos y neutrófilos (Mira y Mañes, 2009). Por otro lado, las estatinas también aumentan los niveles de CCL1, la cual induce la infiltración de células Tregs (Mira et al., 2008).

Otro de los efectos de las estatinas es su función dual sobre la angiogénesis en función de la dosis, ya que a dosis elevadas tienen efecto angiostático, mientras que a dosis bajas potencian la angiogénesis (Weis et al., 2002). Este efecto potenciador es debido a la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), lo que produce un aumento del NO que estimula la producción de VEGF. Además, una de las consecuencias del aumento en la producción de NO por estatinas es la remodelación de la morfología de los vasos sanguíneos tumorales, mejorando su función y estimulando la maduración de los mismos (Chen et al., 2013). Así mismo, también disminuye la permeabilidad vascular inducida por la inflamación a través de la regulación de la localización de componentes de las uniones estrechas endoteliales (Ifergan et al., 2006).

3.2. Efectos anti-tumorales de las estatinas

Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* indican que las estatinas tienen actividad anticancerígena debido a la supresión de la proliferación y a la inducción de la apoptosis de las células tumorales (Dulak y Józkowics, 2005). Sin embargo, debido a que las dosis requeridas para tal actividad son muy elevadas y están asociadas con alta toxicidad (Coimbra et al., 2010), el potencial uso de las estatinas como monoterapia para el tratamiento del cáncer es cuestionable.

La interacción de las estatinas con quimioterapéuticos genera una respuesta aditiva y sinérgica potenciando el efecto del cisplatino (Agarwal et al., 1999), de la doxorubicina (Martirosyan et al., 2010), del 5-fluorouracilo (Agarwal et al., 1999), del etopósido (Roudier et al., 2006) y del melfalán (Drucker et al., 2004). Así pues, el tratamiento del cáncer con estatinas es mucho más efectivo en combinación con la quimioterapia, resultando así muy interesante investigar cuales son los mecanismos moleculares por los cuales dichas estatinas potencian el efecto de los quimioterapéuticos.

4. Superóxido dismutasa extracelular (ECSOD, SOD3)

Las SOD son metaloproteínas que catalizan la conversión del anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es transformado en H_2O y O_2 por acción de las catalasas, peroxiredoxinas o glutatión peroxidasas. Además de esta reacción, las SOD también controlan la formación de especies reactivas del nitrógeno (RNS), pues al disminuir los niveles de $O_2^{\cdot -}$, evitan que este reaccione con el NO y se forme peroxinitrito ($ONOO^-$) (Kwon et al., 2012) (**FIG. 4**). En mamíferos existen 3 isoformas que se diferencian en estructura y localización subcelular. La SOD1 (Cu, Zn-SOD) es citosólica y nuclear, la SOD2 (Mn-SOD) se localiza en la mitocondria y la SOD3 se localiza mayoritariamente en la matriz extracelular (ECM) de los tejidos y glicocálix de las células, donde se ancla al proteoglicano heparansulfato. SOD3 es la isoforma más recientemente descubierta y la menos caracterizada (Che et al., 2016).

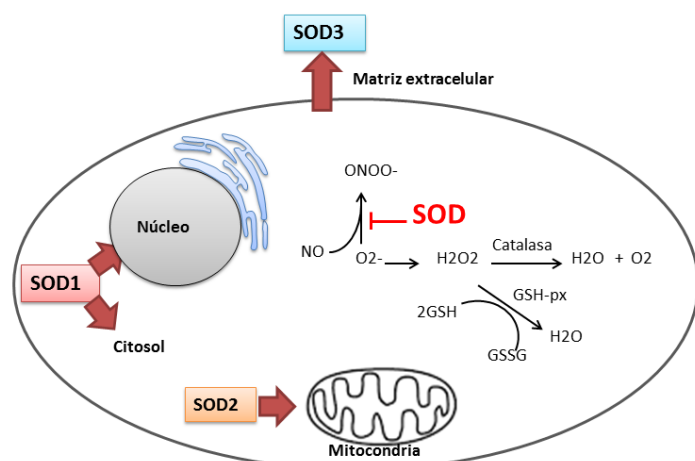


Figura 4. Representación de la localización subcelular de las isoformas SOD y su reacción de dismutación. Figura adaptada de Kwon et al., 2012.

4.1. Estructura y localización de la SOD3

El gen humano de la SOD3 se localiza en el cromosoma 4 y consta de 3 exones (Hendrickson, 1990), mientras que en ratón se localiza en el cromosoma 5 y consiste en 2 exones separados de un intrón de 4 kb (Suh, 1997). En ambos casos la proteína codificada es una glicoproteína de unos 135 kDa formada por dos dímeros unidos mediante puentes disulfuro que constituyen un homotetrámero. Esta proteína tiene tres dominios funcionales (Hjalmarsson, 1987): el primer dominio, del extremo amino terminal, está constituido por los residuos que van del 1 al 95 y contiene el péptido señal para que la proteína sea secretada, además de un sitio de glicosilación en la Asn-89 que le mejora la solubilidad de la misma (Edlund, 1992).

El segundo dominio comprende los residuos 96-193 y contiene el sitio activo de la SOD3, donde se coordinan el Cu y el Zn. Por último, el tercer dominio, comprendido entre los residuos 194-222, contiene la región carboxilo terminal y constituye el dominio de unión a heparina (HBD). Dicho dominio está formado por residuos con cargas positivas que son esenciales para la unión a los proteoglicanos heparán sulfato (Myung-Ja, 2012) (**FIG. 5**).

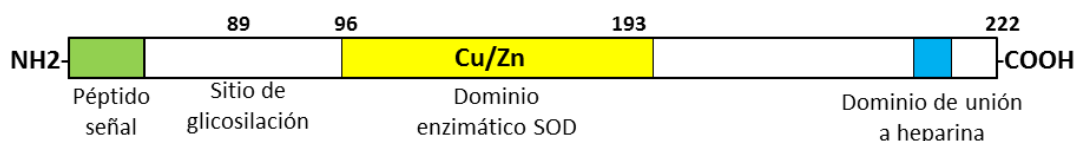


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de la SOD3 murina. La estructura de la SOD3 está formada por el péptido señal en el extremo N terminal, el sitio de glicosilación, el sitio activo de la proteína y el dominio HBD. Figura adaptada de Kwon et al., 2012.

La SOD3 se encuentra presente en mamíferos tanto en forma circulante como unida a tejidos, representando esta última forma el 99% de la SOD3 total (Fukai y Ushio-Fukai, 2011). Esta glicoproteína se expresa mucho en tejidos como pulmón, riñón, útero y corazón, así como en los vasos sanguíneos (Marklund, 1984a; Ookawara, 1998). Dentro de los tejidos, su principal localización es en la matriz extracelular y sobre la superficie celular, con una pequeña fracción en plasma y fluidos extracelulares. Se han descrito algunos polimorfismos para la SOD3 humana, como la sustitución de la arginina en posición 213 por una glicina que causa un incremento de 8-15 veces en los niveles de la SOD3 en plasma debido a la pérdida de afinidad por el heparán sulfato y su no retención en los tejidos (Folz, 1994). Otra mutación descrita es la sustitución de la treonina en posición 241 por alanina; este cambio no afecta a la capacidad de unión a heparina ni a su actividad enzimática (Yamada, 1997).

En el sistema vascular, la SOD3 se expresa principalmente en fibroblastos y células del músculo liso (Stralin, 1995). También se puede encontrar en las células endoteliales, ya que se ancla a su superficie celular a través de la unión a heparán sulfato, fibulina-5 (Nguyen, 2004) y colágeno (Petersen, 2004) siendo así internalizada (Ohta, 1994).

Además, se ha descrito su localización nuclear en fibroblastos después de ser secretada (Ookawara, 2002), así como en tejidos lesionados, donde también se expresa en las células inflamatorias como macrófagos (Luoma, 1998).

4.2. Regulación de la expresión

El promotor de la SOD3 carece de las secuencias típicas TATA o CAAT, pero posee una secuencia rica en purina. Además se han descrito sitios de unión posibles de factores de transcripción de la familia Ets y elementos reguladores NF- κ B.

La regulación de la expresión de la SOD3 depende del tipo celular. Por ejemplo, en fibroblastos la expresión de la SOD3 es inducida por la heparina y el heparán sulfato (Adachi et al., 2001) por IFN- γ e IL-1 α ; sin embargo, dicha expresión es reprimida por TGF- β (Marklund, 1992). En las células del músculo liso vascular (VSMC) y en las células alveolares del pulmón de tipo 2, el IFN- γ y la IL-4 aumentan, mientras que el TNF α , el PDGF (*Platelet-derived growth factor*) y el FGF disminuyen la expresión de la SOD3 (Stralin y Marklund, 2000; Stralin y Marklund, 2001). En células del músculo liso arterial, la SOD3 se induce por factores vasoactivos, como histamina, vasopresina, oxitocina, endotelina-1 y serotonina (Stralin y Marklund, 2001).

La práctica de ejercicio aumenta los niveles de NO en las células endoteliales, lo que induce la expresión de la SOD3 en las células de músculo liso adyacentes (Fukai et al., 2000). Además, existe una regulación en la expresión de la SOD3 que depende del momento de desarrollo. Se ha observado que tanto en pulmones de ratón como de rata, en la última etapa gestacional y después del nacimiento, los niveles de ARNm de la SOD3 aumentan notablemente en comparación con las etapas iniciales de gestación, en las cuales no se detecta (Zelko et al., 2002).

4.3. Funciones fisiológicas de la SOD3

SOD3 juega un papel principal en la biología vascular ya que, como consecuencia de su actividad enzimática, se genera una disminución en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) tales como O₂⁻ y H₂O₂, e indirectamente un aumento en la biodisponibilidad de NO. En condiciones homeostáticas, las ROS son importantes para algunas funciones celulares pues controlan numerosas vías de señalización a través de dos mecanismos principales: i) la inactivación de las proteínas tirosín-fosfatasas (PTP) y (ii) la oxidación de

los receptores tirosin-quinasa lo cual induce su fosforilación (Laukkanen, 2016). Así estimulan el crecimiento, el metabolismo y la proliferación celular, además de activar ciertos factores de transcripción, como NF- κ B o AP-1, y las MMPs, que contribuyen a la inflamación vascular, la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular (Fukai y Ushio-Fukai, 2011). Los niveles celulares de ROS se mantienen en equilibrio mediante un balance entre su producción y la actividad de enzimas antioxidantes. En condiciones patológicas, se genera un desbalance en este equilibrio. El aumento en los niveles de ROS induce una respuesta inflamatoria que se caracteriza por la inducción en la infiltración de leucocitos y en la angiogénesis. Además, un exceso en los niveles de ROS puede inducir la oxidación del ADN, proteínas y lípidos, generando mutaciones o daños en los orgánulos celulares y otras estructuras, o incluso la muerte celular por apoptosis (Imlay, 2003). Esta situación es lo que se conoce como estrés oxidativo.

Otra de las moléculas reguladas por la SOD3 es el NO, cuyas funciones más estudiadas son las que afectan al sistema vascular, al sistema nervioso y a la inflamación. Esta molécula es importante para la vasodilatación, la agregación de plaquetas, la proliferación del músculo liso vascular y las interacciones entre los leucocitos y el endotelio (Gauthier et al., 1995). Además, el NO media en la angiogénesis y su acumulación en las regiones perivasculares reduce la permeabilidad vascular y aumenta la oxigenación tumoral (Kashiwagi et al., 2008).

De esta manera, la ausencia o disminución en la biodisponibilidad de NO puede generar alteraciones patológicas tales como hipertensión y vasoespasmo (Moncada y Higgs, 2006). Por lo que la protección frente a la disminución en la disponibilidad del NO previene el desarrollo de enfermedades vasculares.

Así pues, la SOD3 a través de la regulación de los niveles de ROS y NO ejerce un importante papel en la remodelación vascular. Uno de sus efectos descritos sobre la red vascular es la inhibición de la migración de las células inflamatorias. Esta inhibición se lleva a cabo a través de la atenuación de NF- κ B en un modelo de isquemia en rata, modulando la expresión de TNF α , IL1 α , IL6, CXCL2, CCL2, VCAM, ICAM, P-selectina y E-selectina (Laurila et al., 2009). Otro estudio demostró un papel de la SOD3 en la angiogénesis, cuya sobreexpresión induce la fosforilación del receptor VEGF-R (Oshikawa et al., 2010). Todos los datos observados en varios modelos animales sugieren que la SOD3 es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis tisular, promoviendo la supervivencia celular y la proliferación (Laukkanen, 2016).

5. Superóxido dismutasa extracelular (SOD3) en cáncer

El papel de la SOD3 en el cáncer está poco definido. Generalmente la expresión de esta proteína está regulada negativamente en comparación con el tejido sano en las células de algunos cánceres humanos como el de pulmón, próstata, mama, páncreas y colorectal, debido a una señalización mediada por oncogenes o mecanismos epigenéticos (Cammarota et al., 2015; Teoh-Fitzgerald et al., 2014). De hecho, un descenso en los niveles de la SOD3 se asocia con una elevada incidencia de cáncer y/o mal pronóstico; Singh y Bhat, 2012). Numerosos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que el aumento suprafisiológico en la expresión de SOD3 suprime el crecimiento de los tumores. De esta manera, la transfección de células tumorales con el plásmido de la SOD3 o transducidas con adenovirus que expresan la SOD3 para conseguir niveles suprafisiológicos, aumenta la tasa de proliferación en comparación con las células que tienen niveles moderados de esta enzima (Castellone et al., 2014; Laukkanen et al., 2015; Wheeler et al., 2003).

Uno de los mecanismos por los que la SOD3 inhibe el crecimiento de las células tumorales es a través de la inducción de la respuesta al daño en el ADN (DDR), que incluye la fosforilación de la histona H2AX y de p53, y el aumento en la producción de p21, lo que induce apoptosis (Castellone et al., 2014). Otra de las consecuencias funcionales de la sobreexpresión de la SOD3 es la inhibición de la localización nuclear de NF- κ B, la reducción en la expresión de VEGF-A, la disminución de la proliferación celular y la reducción de la metástasis (Teoh et al., 2007; Wheeler et al., 2003; Tanaka et al., 2001).

Sin embargo, la SOD3 también puede actuar como promotor de la tumorigénesis. La vía de transducción de señales principal en cáncer, RAS-BRAF-MEK1/2-ERK1/2, activa la expresión del ARNm de la SOD3 y su actividad enzimática tanto *in vitro* como *in vivo*. SOD3 a su vez activa los receptores tirosín quinasa de la superficie celular (RTKs), aumenta la fosforilación de los miembros de la familia de las SRC y regula la unión de GTP a pequeñas GTPasas, tales como RAS. Se genera así un circuito de retroalimentación positiva que mantiene esta vía en un estado fosforilado induciendo señales anti-apoptóticas (Laurila et al., 2009). También induce la fosforilación de moléculas de señalización, como AKT, la glucógeno sintasa quinasa 3 y la β -catenina (Laukkanen et al., 2015), por lo que el aumento en los niveles de la SOD3 activa las dos vías principales (RAS-ERK1/2 y β -catenina) relacionadas con el crecimiento celular. También se ha descrito una correlación entre los niveles de VEGF-C y SOD3 en células de cáncer de mama; el aumento en la expresión de la SOD3 dirigida por VEGF-C estimula la tumorigénesis y la metástasis (Wang et al., 2014).

6. Exosomas y comunicación intercelular

En los tumores existe una continua comunicación entre las células tumorales y el microambiente donde se desarrollan. Esta comunicación intercelular es necesaria tanto para la progresión del cáncer como para su tratamiento. Además, es un proceso clave en la remodelación de la vasculatura (Su et al., 2017).

Además de las principales vías de comunicación que existen entre las células, como es la señalización paracrina o a través del contacto directo célula-célula, se ha descrito un mecanismo mediado por la secreción de vesículas extracelulares (Su et al., 2017). Estas se clasifican según su composición lipídica, tamaño y mecanismos de formación en 3 tipos: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Los exosomas son las vesículas más pequeñas, de unos 30-100 nm de diámetro, de origen endocítico y que contienen microARNs (miARNs), ARNs mensajeros (ARNm), fragmentos de ADN y proteínas. Estos exosomas pueden ser transportados de una célula donadora a una célula receptora (Valadi et al., 2007). Los exosomas de diferentes tipos celulares comparten un conjunto de proteínas que incluyen miembros de la familia de las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82), miembros del complejo ESCRT (TSG101, Alix) y proteínas de choque térmico (Hsp 60, Hsp70, Hsp90) (Taylor y Gercel-Taylor, 2011). Además, los exosomas contienen proteínas específicas de las células donde se generan.

6.1. Biogénesis y transporte

Los exosomas se generan a partir de los cuerpos multivesiculares (MVBs). Bajo los estímulos de ciertos factores físicos y/o químicos, se generan invaginaciones de la membrana plasmática mediante un mecanismo dirigido por ceramidas, dando lugar a los endosomas tempranos (EEs) (Trajkovic et al., 2008). Este proceso encapsula moléculas de ARN citoplasmático y proteínas funcionales en las vesículas intraluminales (ILVs) dentro de los cuerpos multivesiculares (MVBs); y esto lo hace a través de los complejos de clasificación endosómica requeridos para el transporte (ESCRT) (Hurley y Odorizzi, 2012).

Los MVB pueden degradarse mediante las proteasas de los lisosomas o pueden fusionarse con la membrana plasmática liberando las ILVs (conocidos como exosomas) al espacio extracelular (van Niel et al., 2006; Simpson et al., 2008).

Una vez liberados los exosomas, alcanzan la célula diana a través de varios mecanismos. El complejo tetraspanina-integrina contribuye notablemente a la unión del exosoma a la célula diana (Nazarenko et al., 2010). La internalización de los exosomas está poco estudiada. Puede ocurrir una señalización yuxtacrina a través de interacciones receptor-ligando, como es el caso del complejo formado entre el receptor de la célula T y el receptor de la quimioquina CXCR4 de los exosomas procedentes de células T (Blanchard et al., 2002). Los exosomas pueden liberar su contenido en el citosol de la célula diana por

fusión con la membrana plasmática (Montecalvo et al., 2012) y también pueden ser fagocitados de una forma dependiente de fosfatidilinositol 3 quinasa y del citoesqueleto de actina (Feng et al., 2010).

6.2. Comunicación tumor-estroma

Numerosas evidencias sugieren que los exosomas juegan un papel fundamental en la comunicación célula-célula en el cáncer. En tumores, los exosomas son secretados por los diferentes tipos celulares que componen el microambiente tumoral creándose una compleja red de interacciones. Estos exosomas son heterogéneos y pueden tener una doble función en cáncer, pues pueden promover el crecimiento y diseminación del cáncer, pero también ejercer su función sobre el sistema inmune estimulando una respuesta anti-tumoral.

Numerosos estudios indican que existe una transferencia de proteínas oncogénicas entre células cancerosas a través de exosomas. Uno de dichos estudios indica que las células de cáncer de colon que contienen los alelos mutantes de KRAS, son capaces de liberar exosomas con estos mutantes. Estos son internalizados por las células de cáncer de colon que expresan el alelo salvaje de KRAS, aumentando así el crecimiento celular y la tumorigénesis (Demory et al., 2013).

Además, los exosomas participan en la inducción de la angiogénesis tumoral mediante la activación de la vía VEGF/VEGFR-2 en células endoteliales (Al-Nedawi, 2009), inhibiendo el factor inducible por hipoxia (HIF)-1 α en células endoteliales (Umezu et al., 2014), o transportando genes relacionados con la angiogénesis, como TSPAN8 (Nazarenko et al., 2010). También se han descrito funciones antiangiogénicas de exosomas, por ejemplo la transferencia del miR-320 desde cardiomiocitos hacia células endoteliales (Wang et al., 2014).

La comunicación mediada por exosomas entre las células del sistema inmune y las células tumorales se ha relacionado mayoritariamente con la inducción de una respuesta pro-tumoral, a través del reclutamiento de células pro-tumorigénicas como MDSCs (Chalmin et al., 2010), o induciendo apoptosis de linfocitos T CD8+ citotóxicos a través del transporte del ligando de FAS (Abusamra et al., 2005). También participan en la respuesta antitumoral mediante el transporte de la proteína de choque térmico (HSP)70, la cual activa directamente las células NK (Gastpar et al., 2005). Los exosomas juegan un papel crucial en la manipulación del microambiente tumoral mediante el establecimiento de una comunicación intercelular entre las células cancerosas y el estroma asociado.

El resumen, la arquitectura desorganizada de los vasos sanguíneos tumorales actúa como una barrera fisiológica para el suministro de fármacos quimioterapéuticos y para la migración de células inmunes en el parénquima tumoral. Esta estructura puede invertirse mediante la normalización de los vasos sanguíneos y la modificación del microambiente tumoral. Hemos centrado nuestro trabajo en determinar el efecto de aumentar los niveles de la superóxido dismutasa extracelular (SOD3) en el estroma del tumor, concretamente en las células endoteliales, sobre la función vascular. También es objeto de nuestro estudio describir los mecanismos moleculares por los cuales la SOD3 remodela el endotelio tumoral así como la influencia de esta modificación sobre la eficiencia de la quimioterapia y la migración de linfocitos T.

OBJETIVOS

1. Determinar el efecto anti-inflamatorio de la lovastatina sobre la progresión de los tumores en ratones MMTVneu

- 1.1 Análisis del crecimiento tumoral en monoterapia y en terapia combinada con el quimioterapéutico doxorubicina
- 1.2 Estudio de los cambios en estructura y función de los vasos sanguíneos tumorales tras el tratamiento con lovastatina
- 1.3 Análisis de la influencia de la lovastatina sobre la composición del infiltrado leucocitario del tumor
- 1.4 Identificación de las moléculas mediadoras de los efectos de la lovastatina sobre el microambiente tumoral

2. Analizar la contribución de la SOD3 en la remodelación del endotelio vascular en tumores

- 2.1. Estudio de la influencia de la SOD3 sobre la eficiencia de la quimioterapia en el modelo de tumor singénico LLC
- 2.2. Estudio sobre la estructura y permeabilidad de la red vascular tumoral
- 2.3. Estudio de la influencia de la SOD3 sobre la composición del infiltrado leucocitario del tumor

3. Estudiar el mecanismo por el cual la SOD3 modifica la función de las células endoteliales

- 3.1. Análisis de la función barrera endotelial
- 3.2. Análisis de la adhesión y migración leucocitaria
- 3.3. Búsqueda de proteínas que interaccionan con la SOD3

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de ratón

Todos los procedimientos realizados en esta tesis con animales están de acuerdo con la directiva de la Comunidad Europea 2010/63/UE y fueron aprobados por el comité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y por la Comunidad de Madrid (PROEX 277/14).

1.1. Ratones transgénicos FVB/N-Tg(MMTVneu) (Tg-neu)

La cepa de ratones FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J se obtuvo de Jackson Laboratory (número de stock 002376). Esta cepa porta el proto-oncogén de rata neu en homocigosis (neu/neu). Para genotipar estos ratones y comprobar la homocigosidad de neu se utilizaron los siguientes oligonucleótidos y sondas (**TABLA 1**):

Gen	Secuencia (5'-3')	Sonda (5'-3')	Fluorocromo
Neu (rata)	Sentido: CCCGAGTGTGTCAGCCTCAAA Antisentido: GCAGGCTGCACACTGATCA	CCGATCCAAAGCAGGTCTCTGAGCTG	FAM
Ngf (ratón)	Sentido: TGCATAGCGTAATGTCCATGTTG Antisentido: TCTCCTTCTGGGACATTGCTATC	ACGGTCTGCCTGTACGCCGATCA	VIC

Tabla 1. Oligonucleótidos para genotipar el proto-oncogén neu

Con estos reactivos se llevó a cabo la reacción de qPCR utilizando como molde ADN genómico procedente de las colas de ratones control heterocigotos para neu y ratones control homocigotos para neu. Las condiciones de amplificación fueron 2 minutos a 50°C seguidos de 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. La cantidad de ADN genómico del proto-oncogén neu fue normalizada con el control interno Nerve Growth Factor (NGF) murino obteniéndose el ΔC_t . A continuación se comparó el control neu heterocigoto, muestra referencia, con la muestra control neu homocigoto y con las muestras problema aplicando la ecuación $2^{-(\Delta C_t - \Delta C_t \text{ referencia})}$. Se aceptaron como homocigotos para neu aquellos animales que mostraron el doble de cantidad de ADN genómico para neu que la muestra referencia.

1.2. Ratones inmunodeficientes Rag2^{-/-}

Para los experimentos de inducción de tumores en ratones inmunodeficientes se utilizaron ratones Rag2^{-/-} en fondo FVB/N (Murphy et al., 2003) que fueron proporcionados por el laboratorio del Dr T. S. Kupper (Brigham and Women's Hospital, Harvard Institute of

Medicine, Boston, USA). El genotipado de estos ratones se realizó mediante PCR semicuantitativa usando oligonucleótidos específicos (**TABLA 2**).

La pareja de oligonucleótidos RAGA y RAGB amplifican el alelo WT (260 pb) y la pareja de oligonucleótidos NEOA y RAGB amplifican el alelo KO (350 pb).

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
RAGA	GGGAGGACACTCACTTGCCAGTA
RAGB	AGTCAGGAGTCTCCATCTCACTGA
NEOA	CGGCCGGAGAACCTGCGTGCAA

Tabla 2. Oligonucleótidos para genotipar los ratones FVB Rag2^{-/-}

1.3. Ratones C57BL/6J silvestres (WT) y deficientes para SOD3 (SOD3^{-/-})

Los ratones C57BL/6J (WT) fueron obtenidos de Jackson Laboratory, mientras que los SOD3^{-/-} en fondo C57BL/6J (Carlsson et al 1995) fueron cedidos por el Dr. Tim Oury (Department of Pathology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA). Para el control del genotipo de estos ratones se utilizaron los oligonucleótidos de la Tabla 3 en la reacción de PCR semicuantitativa. La pareja de oligonucleótidos SOD3 WT y SOD3 COMÚN amplifican el alelo WT (419 pb) y la pareja de oligonucleótidos SOD3 KO y SOD3 COMÚN amplifican el alelo KO (500 pb).

Oligo	Secuencia (5'-3')
SOD3 WT	GCTTCGACCTAGCAGACAGG
SOD3 COMÚN	CACCACGAAGTTGCCAAAGT
SOD3 KO	AATTCGCCAATGACAAGACG

Tabla 3. Oligonucleótidos para genotipar los ratones WT y SOD3^{-/-}

2. Líneas celulares

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron varias líneas celulares que se describen a continuación:

- **N202.1A:** células tumorales aisladas de carcinoma mamario de ratones Tg-MMTVneu (Nanni et al., 2000) cedidas por el Dr. Vincenzo Bronte (Venetian Institute of Molecular Medicine, Padova, Italia) y cultivadas como se describe en González-Martín et al., 2011. Estas células expresan en superficie altos niveles de la glicoproteína neu.
- **LLC:** línea de adenocarcinoma de pulmón de ratones C57BL/6, proporcionada por el Dr. Rolf Brekken (UT-Southwestern Medical Center, Dallas, USA).

- **HEK-293T**: línea celular humana procedente de la transformación de la línea HEK-293 (riñón embrionario) con el antígeno del virus SV40. Estas células fueron obtenidas del banco de células ATCC (*American Type Culture Collection*).

El cultivo de las células N202.1A, LLC y HEK-293T se llevó a cabo en medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 1mM de piruvato sódico, 1% de aminoácidos no esenciales, 2mM de L-glutamina y antibióticos (Penicilina/estreptomicina 100 U/ml).

- **1G11**: células endoteliales murinas obtenidas a partir de endotelio pulmonar (Dong et al., 1997), cedidas amablemente por el laboratorio del doctor Alberto Mantovani (Humanitas Clinical and Research Center, Milano, Italia).
- **1G11-mock, -SOD3 y -SOD3^{S195C}**: células obtenidas por transducción retroviral de las células 1G11 con pRVIRES-gfp, pRV-SOD3-IRES-gfp y pRV-SOD3^{S195C}-IRES-gfp respectivamente como se explica en el apartado 5. Estas células fueron seleccionadas por citometría de flujo (MoFlo XDP; Beckman Coulter) usando la emisión de fluorescencia GFP.

El cultivo de las células 1G11 se realiza en placas de cultivo previamente recubiertas con 1% de gelatina (2 h, 37°C) usando como medio DMEM suplementado con 20% SFB, 1mM de piruvato sódico, 2mM de L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales, 100µg/mL de suplemento para el crecimiento de células endoteliales (ECGS, *endothelial cell growth supplement*), 100µg/mL de heparina y antibióticos. Todas las células se cultivaron en incubadores humidificados a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂.

3. Modelos tumorales y tratamientos

3.1. Modelo de tumores de mama espontáneos en los ratones Tg-neu

A partir de las 20 semanas de edad postnatal se examinaron por palpación las 5 pares de glándulas mamarias de las ratonas Tg-neu semanalmente. A partir de la aparición del primer tumor, los ratones Tg-neu fueron tratados con Lovastatina (Lov 10 mg/Kg, i.p.; Sigma-Aldrich) o vhcl (5% ethanol), 3 veces por semana durante 6 semanas, hasta el sacrificio. En algunos experimentos, se llevó a cabo la administración de doxorubicina (Doxo; 0.5 o 2.5 mg/Kg, 2 veces/semana, i.p., Farmitalia Carlo Erba) o el tratamiento combinado de Lov con Doxo 0.5 mg/Kg.

3.2. Modelo de tumor singénico N202.1A en ratones Tg-neu y Rag2^{-/-}

Las células N202.1A ($0,5 \times 10^6$ en 100 μ l de PBS) fueron inoculadas s.c. en el flanco derecho de ratones Tg-neu y Rag2^{-/-}. A continuación los ratones fueron tratados con Lov (10 mg/Kg i.p.) o vhl (5% ethanol) desde el día de la inyección de las células, 3 veces por semana durante 6 semanas, hasta el sacrificio.

3.3. Modelo de tumor singénico LLC en ratones C57BL/6J y SOD3^{-/-}

Las células LLC ($0,5 \times 10^6$ en 100 μ l de PBS) se inyectaron s.c. en el flanco derecho de ratones C57BL/6J WT y SOD3^{-/-}. Tras una semana, los ratones se aleatorizaron en cuatro grupos que fueron tratados por inyección intraperitoneal con Lov (15 mg/Kg) o vhl durante 10 días solos o en combinación con Doxo (2.5 mg/Kg) en los días 7, 11 y 15 tras la implantación de las células. Los tumores se midieron cada 3 días con un calibre.

Para otros experimentos, tras la inoculación de células LLC en ratones SOD3^{-/-}, los tumores se inyectaron con adenovirus (Ad-mSOD3 o Ad- β Gal, 10^9 pfu/50 μ l, i.t., Unidad de Producción de Vectores, Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica, Barcelona, Spain) en los días 7, 9, 11 y 15. En estos ratones también se llevó a cabo la administración de Doxo (2.5 mg/Kg; ip) en los días 7, 11, y 15

En todos los casos los tumores se midieron periódicamente por medio de un calibre y el volumen tumoral se calculó a partir de las mediciones, aplicando la siguiente fórmula: volumen en mm³=(R x r²)/2; donde r es el radio menor y R el radio mayor del tumor.

4. Muestras humanas

Se usaron muestras de tumores de carcinoma colorrectal (CCR) del banco de tumores del Hospital Clínico San Carlos congelados a partir de tejido fresco entre 2001 y 2006 (Pérez-Villamil et al., 2012). También se emplearon muestras de tumores embebidas en parafina y fijadas con formalina procedentes de pacientes con CCR en estadio III. Se obtuvo el consentimiento apropiado de todos los pacientes y no se registraron los datos personales. El Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos aprobó este estudio.

5. Plásmidos y construcciones virales

5.1. Generación de las partículas retrovirales de SOD3 y del mutante SOD3^{S195C}

El ADNc de SOD3 de ratón clonado en pCMV-Sport6 fue obtenido de Open Biosystems y el mutante SOD3^{S195C} se obtuvo a partir de este plásmido mediante mutagénesis dirigida (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene), usando

oligonucleótidos descritos (Scavenius et al., 2013). Tanto SOD3 como SOD3^{S195C} fueron subclonados en el plásmido pRVIRES-GFP para generar partículas retrovirales y transducir los cultivos celulares como se ha descrito (Mira et al., 2001).

5.2. Generación de la construcción HASOD3

El plásmido pCMV-Sport6-HASOD3 se obtuvo mediante la inserción del *tag* HA entre la secuencia del péptido señal y la proteína madura de SOD3 a través de la estrategia de *In-Fusion HD Cloning* (Takara). En primer lugar, se generó el fragmento de PCR (*Expand High Fidelity PCR System*, Roche) de la secuencia HA flanqueada por secuencia de SOD3 a partir del pCMV-Sport6-SOD3 mediante el empleo de los siguientes oligonucleótidos:

5'-GATCCAGGGGAGTCCTACCCTTATGATGTG-3' (sentido)

5'-AAGCCTGTCTGCTAGGGCATAATCTGGCAC-3' (antisentido)

A continuación se linearizó el plásmido pCMV-Sport6-SOD3 y se mezcló con el fragmento de la PCR anterior llevándose a cabo la reacción *In-Fusion* como se detalla en el *kit*. Finalmente se transformaron bacterias *E.coli* XL1-Blue supercompetentes. De las colonias resultantes se extrajo el ADN plasmídico usando el *kit QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN) y se comprobó por secuenciación (Secugen) la inserción del *tag* y el mantenimiento de la fase de lectura correcta.

6. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

El ARN total fue aislado con el reactivo Tri-Reagent siguiendo el protocolo del fabricante (Sigma-Aldrich) y el ARN obtenido se cuantificó mediante NanoDrop. Para la obtención del ADNc se utilizó el *kit High-Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems). Habitualmente se utilizó 2 µg de ARN total como molde en un volumen de reacción final de 20 µL y la reacción de retrotranscripción se desarrolló en un termociclador (BioRad iCycler).

Una vez obtenido el ADNc se llevaron a cabo las reacciones de qPCR en placas de 384 pocillos en el equipo ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems), utilizando la mezcla de reacción *5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX)* (Solis BioDyne). Las secuencias de los oligonucleótidos cebadores utilizados se detallan en la tabla 4. Las condiciones de la reacción de qPCR fueron: 5 min a 95°C seguidos por 40 ciclos consistentes en 15 s a 95°C y 60 s a 60°C. Se calculó la cantidad relativa de cada gen utilizando el software SDS del equipo a partir de los datos de incremento de fluorescencia con el número de ciclo que nos permitió obtener el valor de Ct. A partir de este valor corregido por los de amplificación de actina o GAPDH para la misma muestra, se obtiene ΔCt. A continuación se resta este valor

de la muestra que se considera referencia ($\Delta\Delta C_t$) y aplicando la ecuación $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ se calcula el valor Rq.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para qPCR

Gen	Secuencia (5'-3')	
mVEGF	Sentido: GCAGCTTGAGTTAAACGAACG	Antisentido: GGTTCGCGAAACCCTGAG
mPIGF	Sentido: CTGGGTTGGCTGTGCATT	Antisentido: GGCACCACTTCCACTTCTGT
mIL1 β	Sentido: TGGTGTGTGACGTTCCATT	Antisentido: CAGCACGAGGCTTTTTTGTG
mIL1 α	Sentido: TTGGTTAAATGACCTGCAACA	Antisentido: GAGCGCTCACGAACAGTTG
mIFN γ	Sentido: TTTCTGGCTGTTACTGCCACG	Antisentido: CTTTTTCGCCTTGCTGTTGC
mCCL17	Sentido: CAGGGATGCCATCGTGTTC	Antisentido: GGCCTTGGGTTTTTCACCA
mArg-1	Sentido: CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	Antisentido: AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
mCD206	Sentido: ATGCCAAGTGGGAAATCTG	Antisentido: TGAGCAGTGGCCTGCATAG
mCCL22	Sentido: CACCCTCTGCCATCACGTTT	Antisentido: CCTGGGATCGGCACAGATAT
mIL10	Sentido: AGGCGCTGTCATCGATTTCTC	Antisentido: TGGCCTGTAGACACCTTGGTC
mTNF α	Sentido: CTGTAGCCACGTCGTAGC	Antisentido: TTGAGATCCATGCCGTTG
mSOD3	Sentido: GGGGAGGCAACTCAGAGG	Antisentido: CCAACATGGCTGAGGTTCTC
hSOD3	Sentido: GGTGCAGCTCTCTTTTCAGG	Antisentido: AACACAGTAGCGCCAGCAT
mVEC	Sentido: GTTCAAGTTTGCCCTGAAGAA	Antisentido: GTGATGTTGGCGGTGTTGT
hVEC	Sentido: GCAGTCCAACGGAACAGAA	Antisentido: CATGAGCCTCTGCATCTTCC
mCXCL14	Sentido: AGACCATCTCCTCTGGGATCC	Antisentido: TTCTTCAGGGTGGCTATGAGC
mCXCL15	Sentido: TTCGAGACCATTACTGCAACAG	Antisentido: ACAGTAGCCTTCACCCATGGA
mCXCL12	Sentido: AGCCAACGTCAAGCATCTGA	Antisentido: TCGGGTCAATGCACACTTGT
mCXCL1	Sentido: CCTTGACCCTGAAGCTCCCT	Antisentido: CGGTGCCATCAGAGCAGTCT
mCXCL16	Sentido: GTGGGTCCGTGAACTAGTGGG	Antisentido: GGGATCTGGCTTGAGGCAAAT
mCCL7	Sentido: TCAGCATCCAAGTGTGGGC	Antisentido: CAGGGACACCGACTACTGGTG
mCCL2	Sentido: TCTGGGCTGCTGTTTACA	Antisentido: TTGGGATCATCTTGCTGGTG
mCXCL10	Sentido: TGCTGGGTCTGAGTGGGACT	Antisentido: CCCTATGGCCCTCATTCTCAC
mIkB α	Sentido: AAGGACGAGGAGTACGAGCAA	Antisentido: GGATGATTGCCAAGTGCAGGA
m β -actina	Sentido: GGCACCACACCTTCTACAATG	Antisentido: TGGATGGCTACGTACATGGCTG
h β -actina	Sentido: CCCAGCACAAATGAAGATCAA	Antisentido: CGATCCACACGGAGTACTTG
mGADPH	Sentido: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	Antisentido: TGAGACCATGTAGTTGAGGTCA
mRn18S	Sentido: GAGAAACGGCTACCACATCC	Antisentido: GGGTCGGGAGTGGGTAAT

7. Análisis de expresión de ARNm mediante microarrays

Se aisló el ARN total a partir de tumores de ratones Tg-neu así como de células 1G11 con *Tri-Reagent* (Sigma-Aldrich), seguido de purificación con el kit *RNeasy* (Qiagen). La calidad de este ARN fue confirmada mediante análisis por electroferograma (Agilent 2100 Bioanalyzer). Para los tumores de ratones Tg-neu, se llevó a cabo la síntesis del ARNc marcado con biotina y su hibridación con el chip *Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 GeneChip array*, el cual contiene 39000 variantes de transcripción de 34000 genes de ratón bien caracterizados. Para las células 1G11, se amplificó el ARN total (200 ng) usando el kit *One Color Low Input Quick Amp Labeling Kit* (Agilent Technologies) y se purificó con el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen).

La preparación de las sondas y la hibridación se realizó tal como se describe en el Manual de Análisis de la Expresión de Genes basado en microarray de un solo color (*Agilent Technologies*. Versión 6.5).

En ambos casos, los valores de intensidad brutos tras la hibridación fueron resumidos y normalizados por el algoritmo *Robust Multi-array Analysis* (RMA) [Murphy et al., 2003]. Para controlar la tasa de falsos positivos (FDR), los valores p fueron corregidos utilizando el método Benjamini-Hochberg [Benjamini y Hochberg, 1995].

Las hibridaciones y el análisis estadístico fueron realizados por el Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología. El visualizador FIESTA (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>), desarrollado por JC Oliveros (Servicio de Bioinformática del CNB), fue utilizado para visualizar todos los resultados de microarrays y para evaluar los umbrales numéricos aplicados a genes diferencialmente expresados. Los archivos originales y los valores de intensidad normalizados de los datos de los tumores Tg-neu se depositaron en la base de datos Omnibus de expresión génica (NCBI-GEO, código de acceso GSE42787, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Para analizar los procesos biológicos del microarray de tumores Tg-neu se usó *GeneCodis*, y para el microarray de las células 1G11 se usó la base de datos *Panther*.

8. Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA)

GSEA es un método computacional usado para detectar conjuntos de genes relevantes asociados a la expresión diferencial de genes de un experimento. Este método se aplicó a los genes de ratón clasificados por su expresión diferencial obtenida a partir de los experimentos de microarrays de las células 1G11-mock y -SOD3 anteriormente expuestos. Se usaron los ratios del Log2 como métrica de clasificación y se usó el sistema de puntuación "weight".

Los conjuntos de genes regulados por el factor de transcripción NF- κ B se descargaron de la base de datos Molecular Signatures Database v6.0 (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) y se usaron aquellos con un FDR < 0.25.

9. Análisis de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Para las tinciones de inmunohistoquímica, los tumores de ratón se escindieron y se congelaron instantáneamente en medio de congelación de tejidos (OCT, Jung). Se hicieron secciones (5-10 μm) de los tumores que se almacenaron a -80°C hasta su uso para lo cual las secciones se descongelaron a temperatura ambiente y fueron fijadas con acetona fría durante 10 minutos. A continuación se llevó a cabo un paso de bloqueo del tejido para evitar uniones inespecíficas, en 10% suero de cabra + 3% BSA en PBS durante 1 hora a 37°C . La hibridación con el anticuerpo primario (TABLA 5) en tampón de bloqueo se realizó durante 16 horas a 4°C , tras la cual se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo (TABLA 5) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se montaron con *Fluoromount-G* con DAPI (SouthernBiotech) y se analizaron en un microscopio confocal Olympus FluoView 1000 usando el objetivo 60x 1.4 oil plan-Apo o con un microscopio Leica (DM RB) equipado con una cámara Olympus DP70. Para las cuantificaciones se utilizó el software *ImageJ*.

El análisis de inmunofluorescencia de células endoteliales en cultivo se llevó a cabo en el sistema *Nunc Lab-Tek Chamber Slide* (Thermo Scientific), el cual se compone de una cámara separada en varios compartimentos unida a un portaobjetos de vidrio (25 \times 75 mm). Las células (0,5 \times 10⁵ células en 200 μl) se sembraron en los pocillos de la cámara previamente tapizados con gelatina. Al día siguiente, se fijaron con 4% PFA durante 10 min a temperatura ambiente, se permeabilizaron con 0,3% Triton X-100 (5 min, temperatura ambiente) y bloquearon durante 1 hora en PBS, 0,5% BSA, 0,1% NaN₃. La hibridación con el anticuerpo primario se llevó a cabo durante 16 horas a 4°C , y con el secundario durante 1 hora a temperatura ambiente (TABLA 5). Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio confocal Olympus FluoView 1000.

La cuantificación de la fluorescencia asociada a p65 en el núcleo se realizó mediante una plataforma computacional basada en MATLAB de código abierto (desarrollada en el laboratorio por Paula Martín), después de la sustracción del fondo inespecífico. Los núcleos se segmentaron usando imágenes DAPI y la segmentación se aplicó al canal Cy3 para medir los píxeles teñidos con p65 dentro del área nuclear y calcular la relación de tinción nuclear respecto al área nuclear total.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Anticuerpos Primarios	Dilución	Casa comercial
anti-CD11b	1:20	Beckman Coulter (clon M1/70)
anti-CD206	1:5	Serotec (clon MR5D3)
anti-CD31	1:200	BD Bioscience (clon MEC13.3)
anti-CD3	1:50	DakoCytomation
anti-CD4	1:200	abcam (clon EPR19514)
anti-CD8	1:50	Biolegend (clon 53-6.7)
anti-F4/80	1:20	eBioscience (clon BM8)
anti-HA	1:1000	Covance (clon 16B12)
anti-nestina	1:200	Abcam
anti-p65	1:800	Cell Signaling (clon L8F6)
anti-SOD3	1:50	Santa Cruz Biotechnology
anti-VEC	1:400	LSBio Inc
Anticuerpos Secundarios		
Donkey anti Rabbit Alexa 546	1:500	Molecular Probes
Goat anti rat Alexa 488	1:200	Molecular Probes
Goat anti mouse IgG Cy3	1:400	Jackson
Goat anti mouse IgG Alexa 488	1:200	Molecular Probes
Mouse anti rat IgG Cy3	1:400	Molecular Probes
Streptavidina cy3	1:1250	Jackson

Los niveles de ROS en células endoteliales 1G11-mock y 1G11-SOD3, cultivadas en medio normal o en medio condicionado tumoral N202.1A se midieron mediante microscopía de fluorescencia con la sonda dihidroetidio (2 μ M, 30 min, 37°C; Invitrogen) cuya oxidación en presencia de iones O_2^- genera fluorescencia roja y sirve para medir de forma indirecta el estrés oxidativo.

10. Análisis de áreas hipóxicas en tumores

Las áreas con hipoxia en los tumores se detectaron con pimonidazol (Hypoxyprobe-1 Omni kit; Natural Pharmacia International) inyectado 30 min antes del sacrificio de los ratones, en tumores fijados con formalina al 10% tamponada (3 h, Sigma-Aldrich) y embebidos en parafina. Las secciones (5-10 μ m) se desparafinaron, rehidrataron y fueron sometidas a exposición de antígenos por calor en tampón citrato (0,01M pH 6; 20 min). Las secciones se tiñeron con el anticuerpo anti-pimonidazol y se contratiñeron con hematoxilina. Finalmente, se montaron con medio de montaje acuoso *Dako Faramount* (Dako) y se analizaron en un microscopio Leica (DM RB) acoplado a una cámara Olympus DP70. Las imágenes se cuantificaron usando el software *Image-Pro Plus*. Los niveles de lactato se midieron en extractos de tumores mediante el kit comercial *Lactate Colorimetric Assay kit* (Abcam) siguiendo el protocolo del fabricante.

11. Análisis de la Perfusión del tumor

Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con lectina de tomate (*Lycopersicon Esculentum Lectin*) marcada con FITC (100ug; Vector Laboratories). A los 10 minutos fueron sacrificados e inmediatamente perfundidos a través del corazón con formalina al 10%. Los tumores fueron extirpados y congelados en medio OCT. Se hicieron secciones de 10 µm de grosor para detectar FITC-lectina y teñir con el anticuerpo anti-CD31 (MEC13.3, BD Biosciences Pharmingen). Los vasos con tinción lectina-FITC+ y CD31+ se determinaron con el software NIH-Image J.

12. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los ratones se perfundieron transcárdialmente con solución salina heparinizada (50 ml) y luego con fijador (PFA al 1%, glutaraldehído al 1% en tampón fosfato 0,1 M, 100 ml) a una presión constante de 120 mm Hg. Los tumores se diseccionaron y se sumergieron durante la noche en el mismo fijador (al 4% de PFA, 4% de glutaraldehído). Después de varios lavados con PBS, cada tumor se cortó por la mitad; uno se mantuvo en la mezcla fijadora y el otro se crioprotegió con 30% de sacarosa y se congeló por inmersión en isopentano enfriado con hielo seco. Las piezas de tumor congeladas se fracturaron golpeando una cuchilla afilada colocada sobre la superficie de la muestra, y luego se descongelaron por inmersión en PBS frío. Las muestras congeladas y no congeladas se fijaron con tetróxido de osmio al 1% en PBS (1 h), se lavaron en agua destilada, se deshidrataron en un gradiente de acetona, que se reemplazó con dióxido de carbono líquido y se evaporó completamente por secado en punto crítico. Para mejorar la conductividad, las muestras fueron revestidas con grafito en un evaporador de alto vacío y luego cubiertas de oro en un dispositivo de pulverización catódica. La red vascular se analizó en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6400.

13. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las células 1G11 se incubaron con medio enriquecido en HASOD3 en los tiempos que se indican. A continuación, tras lavar las células con PBS, se fijaron con paraformaldehído 4% + glutaraldehído 0,1% en PBS, durante 30 minutos a 4°C. Una vez eliminados los restos de fijador, las células se crioprotegieron con glicerol y se crioinmovilizaron por inmersión rápida en etano a -170°C, en un equipo Leica CPC. Posteriormente se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento, el cual se detalla a continuación.

Preparación de los bloques

Las muestras se procesaron mediante criosustitución en metanol/acetato de uranilo al 0,5% durante 58h a -90°C y después de una subida controlada de la temperatura hasta -40°C se embebieron en lowicryl HM20. La polimerización de la resina se realizó mediante luz U.V. durante 48h a -40°C seguida de otras 48h a 20°C. Todo este proceso se realizó en un equipo Leica EM AFS2.

Obtención de los cortes ultrafinos

Se realizaron secciones de 60-70 nm en un ultramicrotomo Leica EM UC6 y se recogieron sobre rejillas de oro de 200 mesh recubiertas con formvar y carbón.

Inmunomarcaje

Para el bloqueo de la muestra, las rejillas se incubaron durante 30 min con tampón de bloqueo (Tris 30 mM pH8, NaCl 150 mM, BSA 1%, Tween-20 0,2%, suero de cabra 5%) a temperatura ambiente.

La incubación con el anticuerpo anti-HA diluido 1:50 en tampón de bloqueo se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavó con TBS y se incubó nuevamente en tampón de bloqueo durante 15 minutos. La hibridación con el anticuerpo secundario (goat anti-mouse 10nm IgG+ IgM 1:40) se realizó durante 45 minutos. Finalmente, se lavaron las rejillas con agua destilada y las imágenes fueron adquiridas con el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1011, operando a 100 kV, acoplado a una cámara Gatan ES1000Ww.

14. Ensayos de permeabilidad

Para el ensayo de permeabilidad *in vivo* se co-inyectó i.v. dextrano de 70 kD conjugado con Texas Red (250 µg; Molecular Probes) y lectina-FITC (100 µg). Tras 10 minutos, los ratones fueron perfundidos transcárdialmente con PBS y 2% PFA in PBS. Los tumores extirpados fueron fijados (2% PFA, 3 h) y congelados en OCT. Las secciones de 40 µm de los tumores fueron analizadas mediante microscopio confocal (Olympus FV1000), y la fluorescencia del dextrano fue cuantificada con el software del microscopio (FV10-ASW, Olympus). La permeabilidad relativa de los vasos se expresó como la proporción entre la intensidad de fluorescencia del dextrano y el número de vasos perfundidos.

Para los análisis de permeabilidad *in vitro*, se sembraron 5×10^4 células 1G11-mock, -SOD3 o -SOD3^{S195C} sobre filtros tipo *transwell* (de 24 mm de diámetro y 0,4 µm de tamaño de poro; Costar) cubiertos con 1% de gelatina. Esta concentración de células forman una monocapa

confluente después de 24 horas en cultivo. La monocapa de células se pretrató con medio condicionado tumoral durante 6 horas, y la permeabilidad de las células endoteliales se analizó añadiendo dextrano-FITC (40 kDa; 1 mg/ml) en DMEM sin rojo fenol. En algunos experimentos, el inhibidor pan-NOS L-NMMA (100 μ M; Cayman) se añadió a las células antes del ensayo. La permeabilidad se determinó mediante la lectura de la fluorescencia del pocillo inferior (FilterMax F5 Multi-mode Reader, Molecular Devices). Los valores de fluorescencia se extrapolaron a una curva estándar usando cantidades conocidas de dextrano-FITC.

15. Cuantificación de doxorubicina

Los niveles intratumorales de Doxo se cuantificaron en extractos tumorales un día después de la última dosis de Doxo. Los tumores (100 mg) se homogeneizaron en 0,5 ml de PBS con daunorubicina (625 pmoles) como patrón interno. El homogenado (0,1 ml) se trató con 4 volúmenes de acetona fría y la mezcla se mantuvo a -20°C durante 150 min. Después de la centrifugación de las proteínas precipitadas (16.000 g, 10 min), la solución orgánica se recuperó y la acetona se evaporó bajo una corriente de nitrógeno. El material resultante se disolvió en la fase móvil (0,2 ml) y se inyectó (0,1 ml) en un Waters 2690 Alliance System acoplado a un detector de fluorescencia Waters 2475 (excitación: 480 nm, emisión: 560 nm). El software Empower (Waters Corporation) se utilizó para el control de instrumentos y la adquisición y procesamiento de datos. Las moléculas se separaron en una columna de fase inversa C18 (Kromasil 100 C18 15 x 0,4 cm, 0,5 μ m, Teknokroma), con una mezcla de acetonitrilo: agua 22:78, conteniendo ambos 0,2% de ácido fórmico y 0,2% de formiato de amonio, como la fase móvil. Se compararon las áreas cromatográficas correspondientes a la Doxo con las de la daunorubicina, calculándose así las cantidades a partir de una curva de calibración construida mezclando diferentes cantidades de Doxo (5, 10, 20, 40 y 80 pmol) con una cantidad fija de daunorubicina (40 pmol).

16. Detección del NO

Para la detección de NO *in vivo*, a los ratones con tumores se les co-inyectó lectina-FITC y la sonda de NO fluorescente 4,5-diamino-rhodamine B (DAR-1; 320 μ g en DMSO; Sigma-Aldrich). Tras 1 hora, los ratones fueron perfundidos mediante inyección de PBS intracardiaca, y los tumores fueron extirpados, fijados con 2% PFA (3 h) y congelados en OCT. Las secciones de 40 μ m fueron analizadas mediante microscopio confocal (Leica TSC SP5). Para la cuantificación de las imágenes se usó ImageJ; el pseudocolor de las imágenes se obtuvo con el software confocal Leica (LAS AF 2.6.0).

La cuantificación del NO en las células endoteliales se llevó a cabo según se describe en Strijdom et al., 2004. En resumen, las células 1G11 fueron infectadas con los virus Ad-C y Ad-mSOD3 y se incubaron al día siguiente (3 h, 37°C) con la sonda de NO fluorescente 4,5-diamofluorescein (DAF2, 10 µM; Sigma-Aldrich). Las células se analizaron mediante FACS usando células sin tratar con DAF2 como control negativo.

17. Aislamiento de subpoblaciones celulares del tumor

Los tumores fueron digeridos (1 hora, 37°C) en medio Leibovitz's L-15 con 300 U/mL de Colagenasa y 100 U/mL de Hialuronidasa (Stem Cell Technologies). La digestión se detuvo por adición de HBSS (Gibco) con HEPES 10 mM y 2% FCS. Las suspensiones de células individuales resultantes se incubaron secuencialmente con Anti-CD45 (clon 30-F11) y -TER119 (TER119, BD Biosciences), seguido de microesferas magnéticas cubiertas con IgG anti-rata (Dynabeads, Invitrogen). Las células restantes fueron aisladas por FACS (Beckman Coulter) después de la tinción con anti-CD31-PE (MEC 13.3) y -CD24-FITC (M1 / 69; BD Biosciences). Las fracciones celulares aisladas fueron lisadas inmediatamente con el reactivo *TRI Reagent* (Sigma-Aldrich) o con el *EasyRNA kit* (QIAGEN; solo en muestras con células $\leq 5 \times 10^5$) y las muestras se almacenaron (-80° C) para la extracción de ARN. La eficiencia del aislamiento se determinó por tinción de las muestras con anti-CD45-FITC (clon I3/2.3), CD31-PE (clon MEC 13.3), y CD24-PE-Cy5 (clon M1/69) (BD Biosciences) y con *Violet Live/Dead Cell Stain Kit* (Invitrogen) para descartar las células muertas.

18. Determinación del infiltrado leucocitario en tumores

Los tumores se digirieron (90 min, 37°C) con colagenasa P (1 mg/ml; Roche) y DNasa I (100 µg/ml, Roche) y la suspensión celular resultante de la digestión se filtró a través de un *cell strainer* de 40 µm. Estas muestras se tiñeron con los anticuerpos específicos de marcadores de superficie (TABLA 6) para analizar el infiltrado leucocitario mediante FACS usando el citómetro Cytomics FC500, Beckman Coulter.

Tabla 6. Anticuerpos usados en el marcaje de leucocitos

Anticuerpo	Casa comercial
anti-CD11b	eBioscience (clon M1/70)
anti-CD11c	eBioscience (clon N418)
Anti-CD19	BD Pharmingen (clon 1D3)
Anti-CD3	eBioscience (clon 145-2C11)
Anti-CD4	Beckman Coulter (clon GK1.5)
Anti-CD45	BD Pharmingen (clon I3/3)
Anti-CD8	eBioscience (clon 53-6.7)
Anti-Gr1	Beckman Coulter (clon RB6-8C5)
Anti-Mac3	BD Pharmingen (clon M3/84)
Anti-NK1.1	BD Pharmingen (clon PK136)

19. Ensayos de adhesión y migración de leucocitos *in vitro*

Los leucocitos se aislaron de bazo de ratones y el tejido fue disgregado mecánicamente sobre un *cell strainer* (40 μ M diámetro) y se lisaron los eritrocitos con 0,85% NH₄Cl (5min, temperatura ambiente). Los esplenocitos se bloquearon con IgG murina (10 min, 4°C) y luego se incubaron con los anticuerpos anti-CD19 y anti-CD3 para aislar células CD11b⁺ o con anti-CD19 y anti-CD11 para purificar células CD3⁺ (20 min, 4°C). A continuación, se añadieron las microesferas magnéticas recubiertas con IgG anti-rata (30 min, 4°C) para eliminar las células unidas a los anticuerpos obteniéndose así por selección negativa ambos tipos celulares.

Los ensayos de migración se realizaron en *transwells* (Corning) de 3 μ m de tamaño de poro (CD3⁺) o 5 μ m (CD11b⁺; 10⁶/pocillo en ambos casos), en los que el día anterior se sembró una monocapa de células 1G11, 1G11-mock o -SOD3 (5x10⁴ células). En el pocillo inferior se añadió como quimioatrayente medio condicionado tumoral de células N202.1A crecidas durante 5 días. Tras 3 horas de incubación, las células que migraron a la cámara inferior se analizaron mediante citometría de flujo (Cytomics FC500; Beckman Coulter).

Para los ensayos de adhesión en cámaras de 8 pocillos (Nunc), las células CD3⁺ y CD11b⁺ se tiñeron con CMTMR (1 μ M CMTMR in PBS, 30 min, 37°C; Invitrogen). Se sembraron células 1G11-mock o -SOD3 (1x10⁵/pocillo) y a las 24 horas se añadieron los leucocitos marcados (10⁶/pocillo) y se incubaron durante 1, 10, 20 o 30 min a 37°C. Transcurrido el tiempo de adhesión y tras el lavado con PBS, las células adheridas se fijaron con 4% formaldehído (5 min) y se tiñeron con Vectashield con DAPI (Vector Labs). Se tomaron imágenes con el microscopio Olympus FluoView 1000 system y se cuantificaron las células adheridas mediante el software ImageJ.

Para los experimentos de inhibición de NF- κ B, las células 1G11 se pretataron con el inhibidor BAY 11-7082 (Selleckchem) (2 μ M, 1 hora, 37°C) o DMSO a la misma concentración, y a continuación se trataron con TNF α (10 ng/mL, 6 h, 37°C). Una vez purificados los leucocitos, se marcaron diferencialmente con sondas fluorescentes y se mezclaron en proporción 1:1. Para el ensayo de adhesión las células CD3⁺ se marcaron con la sonda fluorescente CMTMR (1 μ M en PBS, 30 min, 37°C) y las células CD11b⁺ con CFSE (2 μ M en PBS, 30 min, 37°C, ThermoFisher Scientific). Para el ensayo de quimiotaxis, las células CD3⁺ se marcaron con CMAC (1:1000 en PBS, 30 min, 37°C, ThermoFisher Scientific), y las CD11b⁺ con CFSE (2 μ M en PBS, 30 min, 37°C). En el ensayo de adhesión, la fluorescencia de cada marcador se cuantificó mediante un lector de fluorescencia (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader), y en el de quimiotaxis mediante citometría de flujo (Cytomics FC500; Beckman Coulter).

20. Inmunoblot

Los extractos de proteínas fueron obtenidos con el tampón de lisis celular RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 1%, deoxicolato sódico 0,5% y SDS 0,1%) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (PMSF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, leupeptina 10 μ g/ml, aprotinina 10 μ g/ml, NaF 5 mM,). Las proteínas se cuantificaron mediante el *Micro BCA Protein Assay Kit* (Pierce) y se separaron en condiciones desnaturizantes por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el método Laemmli usando el tampón de electroforesis Tris-Glicina.

La transferencia se hizo en membrana de nitrocelulosa y el bloqueo de la misma se llevó a cabo en TBS-Tween20 con leche desnatada al 5%. Tras la hibridación con los anticuerpos primarios y secundarios acoplados a HRP (*horseradish peroxidase*) (**TABLA 7**), se reveló con el sustrato ECL (Amersham).

Tabla 7. Anticuerpos utilizados para inmunoblot

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
anti-SOD3	1:200	Santa Cruz Biotechnology
anti-VEC	1:200	LSBio
anti-pan Cadherina	1:1000	Sigma (clon CH-19)
anti-IkBa	1:1000	Cell Signaling (clon 44D4)
anti-HA	1:1000	Covance (clon 16B12)
anti-Ubiquitina	1:200	Santa Cruz Biotechnology (clon P4D1)
anti-CD9	1:2000	Abcam (clon EPR2949)
anti- β Actina	1:5000	Sigma Aldrich
Anti- β Tubulina	1:5000	Sigma Aldrich
Anticuerpos secundarios conjugados a HRP	1:2000	Dako

21. Ensayos ELISA

Se midieron los niveles de PIGF endógeno en los tumores de ratones Tg-neu tratados con vhl o Lov. Para ello se extrajeron las proteínas mediante el uso del tampón RIPA y se llevó a cabo la inmunodetección de PIGF con el *mouse PIGF-2 immunoassay* (R&D Systems).

Para medir la concentración de la quimioquina CCL2 en células 1G11-mock y 1G11-SOD3, se recogieron los medios condicionados de estas células tras 48h de crecimiento y se realizó el ensayo de ELISA con el kit comercial *mouse MCP-1 ELISA MAX Standard Set* (Biolegend, 432701) según las instrucciones del fabricante.

22. Ensayos de Ubiquitinación

Para el análisis de ubiquitinación de IkBa se llevó a cabo el protocolo como se describe en Carmody et al., 2007. Las células 1G11-mock y -SOD3 fueron tratadas con el inhibidor del proteosoma MG132 (20 μ M; Selleckchem) durante la última media hora de estimulación con TNF α .

Las células fueron lisadas en tampón RIPA suplementado con 1% SDS, 20 μ M NEM (N-ethylmaleimide; Sigma-Aldrich) y el cocktail de inhibidores de proteasas *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail* (Roche); los lisados totales (250 μ g) fueron inmunoprecipitados con 2 μ g de anti-IkBa (Cell Signaling, clon 44D4) y esferas magnéticas con proteína A/G (Protein A/G MagBeads, GenScript). Las proteínas unidas fueron eluidas con glicina 0,1 M, pH 2,3 y neutralizadas para ser resueltas por SDS-PAGE. Finalmente se llevó a cabo el inmunoblot secuencialmente con los anticuerpos anti-IkBa y anti-ubiquitina.

23. Ensayos de promotor

En los ensayos del promotor de VE-Cadherina utilizamos el plásmido pGL3-VEC-Luc (promotor VEC de 2,4 kb) (Andriana et al., 2012) que fue cedido por el Dr. Q. Xu (British Heart Foundation Centre, King's College London, England). Las células 1G11 fueron transfectadas de forma transitoria usando Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific) con la mezcla de los siguientes plásmidos: pGL3-VEC-Luc + pRV-SOD3-IRES-gfp ó pRV-IRES-gfp (mock control) + pRL-SV40-Luc Renilla (como control interno), en una proporción 6:3:1. Además, en algunos experimentos las células transfectadas se incubaron con el donante de NO DETA-NONOate (casa comercial) ó con el inhibidor de sintetasas de óxido nítrico L-NMMA (Cayman), usando la cantidad equivalente de DMSO como solvente de los reactivos. Las actividades luciferasa *firefly* y *renilla* se midieron 72 horas después de la transfección usando *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega). La actividad relativa del promotor fue calculada como el cociente entre actividad *firefly* y actividad *renilla*.

Para medir la actividad de NF- κ B se usó el plásmido p-(NF- κ B)₃-LUC (Ricote et al., 1998) cedido por M. Ricote (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares). Se transfectaron células 1G11-mock y 1G11-SOD3 con p-(NF- κ B)₃-LUC + pRL-SV40-Luc Renilla (como control interno), en una proporción 4:1. A las 48 horas de la transfección, se estimularon las células con medio condicionado tumoral N202.1A (60 y 180 minutos) o con TNF α (10ng/mL, 6h).

En los experimentos de inhibición de NF- κ B, se pre-incubaron las células con BAY 11-1782 2 μ M durante 1 hora antes de la estimulación con medio tumoral o TNF α . La actividad relativa de este promotor se calculó como se ha descrito para el promotor de VE-Cadherina.

24. Purificación de HA-SOD3

Para la purificación de la proteína HASOD3 se transfectaron células HEK293T con pCMV-Sport6-HASOD3 y Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células se cultivaron 5 días consecutivos en medio con 0,1% BSA y se comenzó la purificación con 150 ml de este medio y 100 μ L de microesferas de agarosa conjugadas con el anticuerpo anti-HA (*HA Epitope Tag Antibody Agarose conjugate*, clon 2-2.2.14, Thermo Scientific) incubándose durante toda la noche a 4°C. Tras centrifugar (400 x g, 5 min) y separar el sobrenadante (fracción no unida), las microesferas se transfirieron a una columna de cromatografía (*Poly-Prep Chromatography Columns*, BIO-RAD). Tras 3 lavados de la columna con tampón de lavado (TRIS HCl 50mM, pH 7,5) se eluyó la proteína con el péptido HA a elevada concentración (1mg/mL). Para eliminar el péptido HA de la preparación se usaron filtros de tipo Amicon para cambiar el solvente de la proteína a TRIS HCl 50mM, pH 7,5. Para estimar la concentración de la proteína purificada se analizó por electroforesis en gel junto con un patrón de albumina de suero bovino (BSA) y tras tinción con azul de Coomassie.

25. Ensayo de actividad enzimática SOD

Para medir la actividad enzimática de SOD3 WT y de HA-SOD3 en el medio de las células HEK293T transfectadas así como de la proteína purificada HA-SOD3, usamos el *kit* comercial *OxiSelect Superoxide Dismutase Activity Assay* (Cell Biolabs), el cual usa un sistema xantina/xantina oxidasa (XOD) para generar aniones superóxido. Estos aniones son detectados con una solución cromógena, pero en presencia de actividad SOD, la concentración de estos aniones disminuye y se emite menos señal colorimétrica. La detección de la absorbancia se llevó a cabo mediante un lector de placa (*FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader*, Molecular Devices).

26. Aislamiento y caracterización de exosomas

Los exosomas se aislaron mediante centrifugación diferencial como se describe en Ashiru et al., 2010. Las células HEK293T se cultivaron durante 5 días en medio de crecimiento sin SFB (0,2% BSA), el cual se recogió y se centrifugó dos veces (10 min, 300g) para eliminar los restos celulares. A continuación se centrifugó 30 min a 10.000g y luego durante 2h a 100.000g. El precipitado de la última centrifugación se resuspendió en tampón HEPES 10mM, NaCl 130 mM. Para análisis mediante inmunoblot, los exosomas fueron directamente solubilizados en tampón de carga SDS.

Para análisis de microscopía electrónica, se llevó a cabo la adsorción de la fracción de exosomas recién purificada a rejillas de níquel ionizadas y recubiertas con coloidón y una capa de carbón evaporado. Las rejillas se trataron con saponina 0,1% en PBS (5min), luego se bloquearon 10 min en PBS al 10% SFB, y se incubó con el anticuerpo anti-HA diluido en PBS al 5% SFB durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS, se incubó con el anticuerpo secundario unido a oro de 5 nm durante 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, las rejillas se tiñeron con acetato de uranilo al 1% en agua destilada durante 40 segundos.

27. Espectrometría de masas. Proteómica cuantitativa *label free*

Para identificar las proteínas que interaccionan con la SOD3, se incubaron células HEK293T en presencia de medio enriquecido con la HASOD3 durante 5 horas a 37°C. A continuación se lisaron las células en tampón con el detergente no iónico NP-40 al 0,5% (Tris-HCl 10 mM, KCl 10 mM, NaCl 150 mM, NP-40 0,5%) más inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los extractos celulares fueron incubados con microesferas de agarosa conjugadas con el anticuerpo anti-HA (*HA Epitope Tag Antibody Agarose conjugate*, 2-2.2.14, Thermo Scientific) 16 horas a 4° C. Seguidamente se realizaron 4 lavados, 2 con tampón de lisis y 2 con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5.

A continuación, las muestras se analizaron en el servicio de proteómica del CNB mediante nano HPLC-MS/MS de alta resolución Triple ToF. En resumen, se llevó a cabo la carga de las muestras en geles concentradores y la digestión trípica en gel, previa reducción y alquilación con iodoacetamida. A partir de los espectros de fragmentación obtenidos se identificaron péptidos mediante la utilización de distintos motores de búsqueda (Mascot, OMSSA, X! Tandem, Myrimatch). Estos motores utilizan bases de datos *target-decoy* sobre las que se comparan los espectros de fragmentación experimentales, obteniéndose distintas puntuaciones individuales (*scores*). Además, se aplica una tasa de error (FDR), considerándose para criterios cuantitativos tan sólo el conjunto de péptidos con FDR <1%. Para el análisis de regulación diferencial, se llevo a cabo el método de cuantificación label-free, desarrollado por Proteobotics S. L., considerando como regulación de alta confianza las proteínas con q valor <0,01.

28. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media, SEM. Se aplicó la prueba *t de Student* de dos colas o prueba ANOVA de una vía usando el contraste *post-hoc* de Dunnett para comparar los datos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Efecto del tratamiento con lovastatina sobre la vasculatura y el infiltrado en tumores de mama de ratones FVB/N-Tg (MMTVneu)

Las estatinas, además de inhibir la síntesis de colesterol, tienen actividad anti-inflamatoria y/o inmunomoduladora (Mira y Mañes, 2009). Previamente en el laboratorio se describió que el tratamiento con lovastatina tenía un efecto inmunomodulador *in vivo* a través del control de la expresión de quimioquinas en un modelo de respuesta a exposición de antígeno (Mira et al., 2008).

En esta tesis se llevó a cabo el tratamiento con la estatina natural lovastatina (Lov) como agente anti-inflamatorio en modelos tumorales de ratón donde analizamos la influencia de modificar el estroma sobre la evolución del cáncer. En concreto, nos centramos en la búsqueda de moléculas que regulan la función de la vasculatura tumoral.

1.1. La lovastatina reduce la aparición de nuevas lesiones tumorales

Con objeto de analizar los mecanismos que pudieran mediar el efecto de las estatinas en modelos tumorales de ratón, se llevó a cabo el tratamiento de ratones transgénicos FVB/N-Tg(MMTVneu) (Tg-neu) con Lov. Estos ratones sobreexpresan el protooncogen neu en la glándula mamaria y desarrollan tumores de mama de forma espontánea (t_{50} = 6 meses). Tan pronto como se detectaron los tumores por palpación, los ratones se aleatorizaron para la administración de lovastatina (Lov) o etanol (vhcl), (**FIG. 6A**). La dosis de lovastatina (10 mg/Kg, i.p.; 3 días/semana; 6 semanas) era comparable a la dosis empleada en humanos (40 mg/día) (Mira et al., 2008).

Tras la detección del primer tumor, se estudió la cinética de crecimiento del mismo y su peso a tiempo final. Tanto la cinética de crecimiento de los tumores primarios (**FIG. 6B**) como el peso a tiempo final de los mismos (**FIG. 6C**) no se vieron alteradas por el tratamiento con Lov.

Sin embargo, observamos una reducción significativa de la aparición de nuevos tumores en los ratones que habían sido tratados con Lov comparados con los vhcl (**FIG. 6D**).

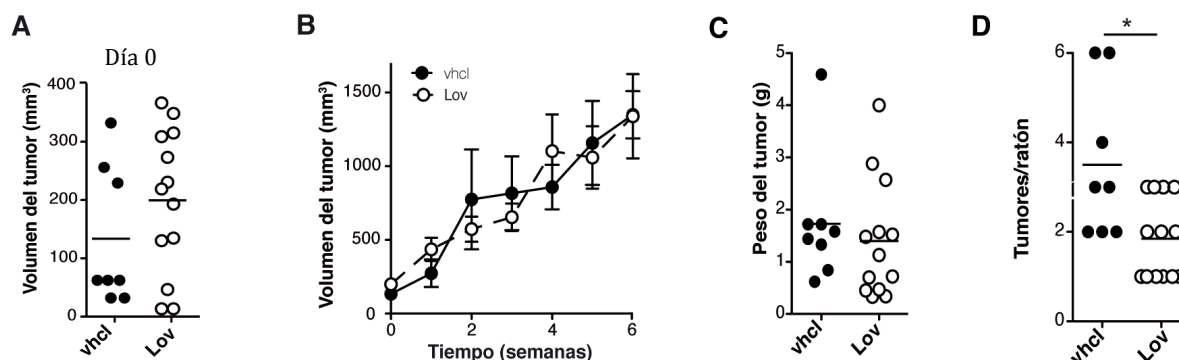


Figura 6. Lovastatina reduce la aparición de nuevos tumores en ratones Tg-neu. Los ratones Tg-neu fueron aleatorizados para el tratamiento con vhcl (n=8) o Lov (n=13) después de la detección del tumor. A) Volumen de los tumores antes del tratamiento. B) Cinética de crecimiento de los tumores primarios en ratones Tg-neu tratados con vhcl o Lov. C) Peso del tumor primario después de sacrificar el ratón. D) Número de tumores por ratón a las 6 semanas de tratamiento. * $p < 0,05$, prueba *t* de Student de dos colas.

Por tanto, en sintonía con otros estudios (Jakobisiak M y Golab J, 2003), nuestros resultados indicaron que el tratamiento con Lov en monoterapia no es efectivo en inhibir el crecimiento de los tumores mamarios en ratones Tg-neu, pero si impidió la aparición de nuevas lesiones oncogénicas en dichos ratones.

1.2. El tratamiento con lovastatina potencia la quimioterapia

Se ha descrito que las estatinas podrían coadyuvar la actividad de algunos quimioterapéuticos (revisado en Jakobisiak M y Golab J, 2010). Para analizar si Lov potenciaba el efecto quimioterapéutico de la doxorrubicina (Doxo) en el modelo Tg-neu, se administraron dos dosis de Doxo (0,5 y 2,5 mg/Kg; i.p.; 2 días/semana; 6 semanas) en combinación con Lov o vhcl. La carga tumoral en los ratones tratados con la dosis más baja de Doxo (0,5 mg/Kg) y los tratados con Lov fue equivalente (FIG. 7A). Sin embargo, la administración de la dosis subóptima de Doxo (0,5 mg/Kg) en combinación con Lov redujo la carga tumoral a niveles comparables a los observados con una dosis de Doxo 5 veces mayor (FIG. 7A).

Además el tratamiento Doxo 0,5 + Lov también disminuyó el número de tumores por ratón comparado con el tratamiento Doxo 0,5 + Vhcl (FIG. 7B); esta reducción fue comparable al efecto de la administración de dosis alta de Doxo (2,5 mg/Kg). El aumento en la actividad quimioterapéutica de Doxo en combinación con Lov puede deberse a un incremento en la actividad citotóxica de la doxorrubicina, o a un aumento de los niveles de Doxo en el parénquima tumoral. Para analizar esta última posibilidad, cuantificamos el contenido en Doxo de las muestras tumorales de ratones tratados con Doxo 0,5 + Lov o Doxo 0,5 + vhcl mediante HPLC-FD (FIG. 7C). Observamos que la coadministración de

Doxo + Lov aumentó significativamente los niveles de Doxo en los tumores comparado con Doxo + vhcl (**FIG. 7D**).

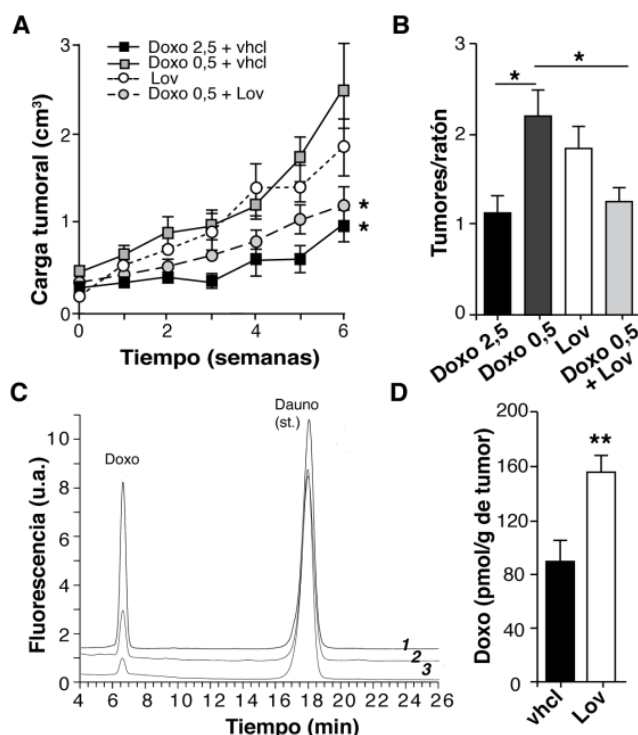


Figura 7. La lovastatina mejora la quimioterapia aumentando los niveles de Doxo en tumores Tg-neu. A) Cinética de crecimiento de tumores espontáneos de ratones Tg-neu tratados con Lov, Doxo (2,5mg/Kg), Doxo (0,5mg/Kg)+vhcl o Doxo (0,5mg/Kg)+Lov (n= 10 en cada grupo); * p<0,05, ANOVA de medidas repetidas y test de Dunnett post-hoc (Doxo0.5+Vhcl como referencia). (B) Número de tumores medio de los ratones en A (p<0,05, prueba ANOVA de una vía con test de Dunnett post-hoc (Doxo0.5+Vhcl como referencia). C) Perfiles HPLC-FD de un extracto de tejido que contiene Doxo y daunorrubicina en cantidades conocidas (1), y muestras de tumores representativos de ratones tratados con Doxo(0,5 mg/Kg)+Lov (2) o Doxo(0,5 mg/Kg)+ vhcl (3). D) Cuantificación de Doxo en las muestras a partir del análisis por HPLC-FD (n = 6; **p <0,01 prueba de Mann-Whitney).

Por lo tanto, en ratones Tg-neu, la administración de lovastatina aumenta el contenido en Doxo en el tumor.

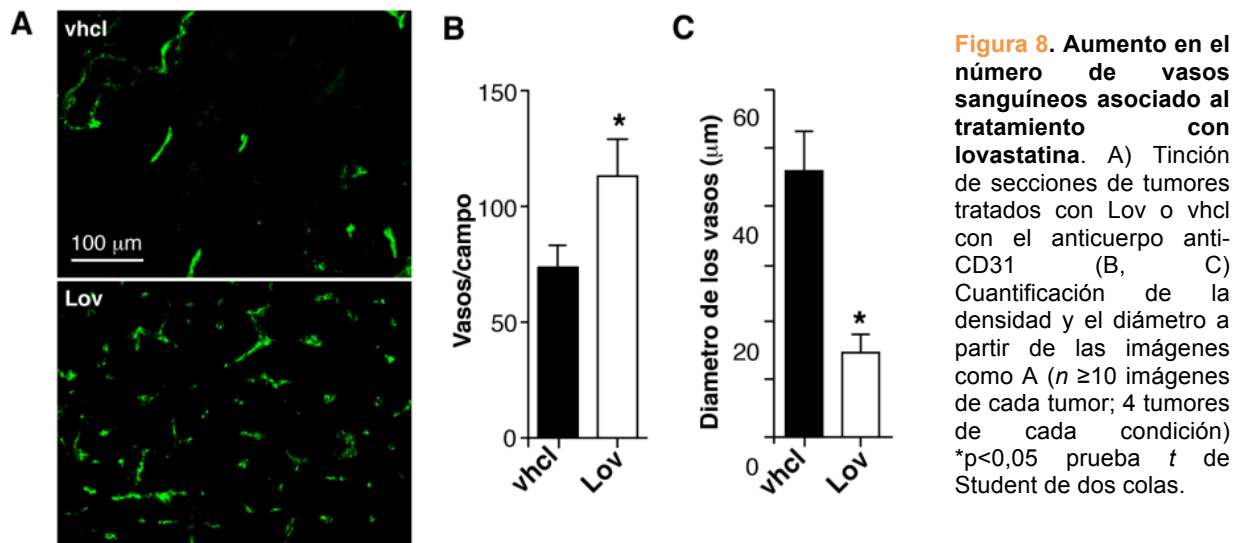
1.3. El tratamiento con lovastatina remodela la vasculatura y mejora la oxigenación tumoral

Se ha descrito que las estatinas reducen la permeabilidad vascular, mantienen la integridad de las uniones endoteliales y mejoran la perfusión sanguínea en algunas enfermedades como la retinopatía diabética (Chen et al., 2013). En tumores, la mejora de la perfusión de fármacos esta asociada a cambios en estructura y función de los vasos sanguíneos. En este modelo tumoral el tratamiento con Lov aumentó el contenido de Doxo en el tumor por lo que analizamos a continuación el estado de la vasculatura.

1.3.1 Cambios en el fenotipo de los vasos sanguíneos y en la asociación de pericitos

Analizamos si el tratamiento con Lov afectaba a la angiogénesis en los tumores de los ratones Tg-neu cuantificando el número y tamaño de las estructuras CD31⁺ (marcador de células endoteliales) en tumores aislados de ratones tratados con Lov o vhcl. El

tratamiento con Lov aumentaba el número de vasos (**FIG. 8A, B**) y reducía su diámetro (**FIG. 8C**) comparado con los tratados con vhcl.



Esta reducción en el diámetro de los vasos también se observó mediante microscopía electrónica de barrido (**FIG. 9A, B**). Así mismo, los vasos sanguíneos de los tumores tratados con vhcl presentaban anomalías en las EC, presentando bordes irregulares y discontinuidades en el lecho vascular (**FIG. 9C, E**). Mientras que en los tratados con Lov, los vasos tenían una estructura más regular y continua (**FIG. 9D, F**).

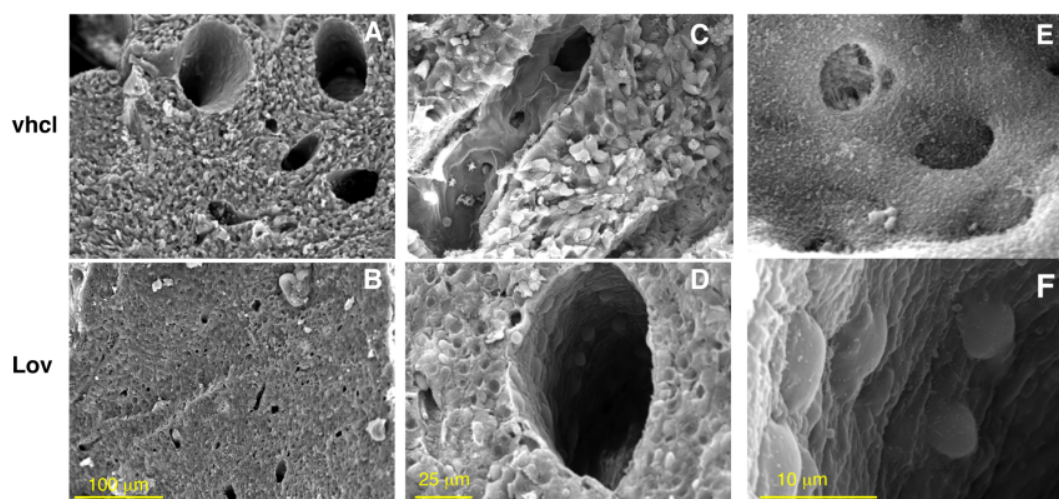


Figura 9. La lovastatina regula la estructura de la vasculatura tumoral. Ultraestructura por microscopía electrónica de barrido de los vasos sanguíneos de tumores de ratones Tg-neu tratados con vhcl (A, C, E) y con Lov (B, D, F).

Las irregularidades en la morfología de las EC normalmente están asociadas a una escasa cobertura por pericitos o células murales (Mitali et al., 2009). La tinción con nestina, un marcador de pericitos, demostró un aumento significativo de la colocalización entre nestina y CD31 en tumores tratados con Lov, sugiriendo una mayor cobertura de los vasos sanguíneos del tumor con pericitos (FIG. 10A, B).

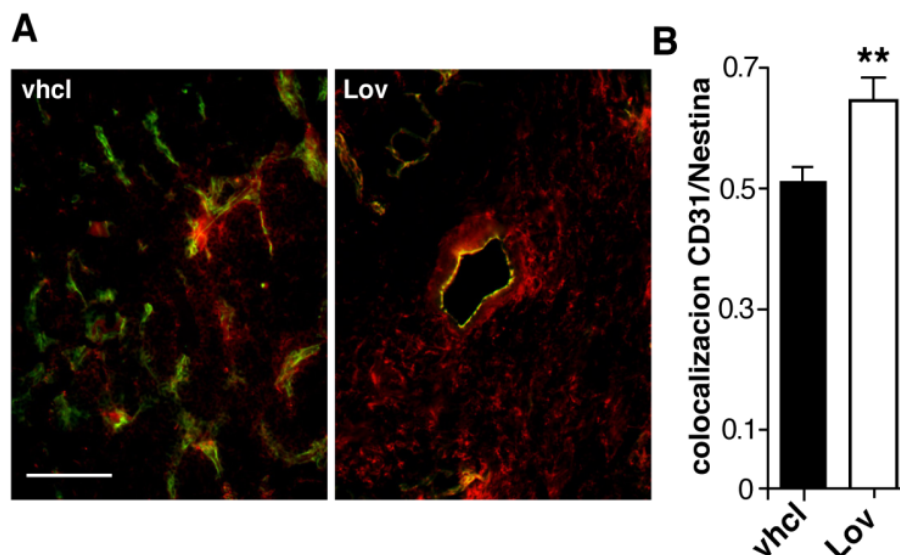


Figura 10. Lovastatina aumenta el recubrimiento de los vasos sanguíneos con pericitos. A) Tinción de vasos sanguíneos (CD31⁺, en verde) y de pericitos (nestina, en rojo) en tumores de ratones vhcl y Lov; en amarillo se muestran las zonas de doble tinción. B) Cuantificación de la colocalización de nestina y CD31 en las imágenes como A (n ≥30 de al menos 3 tumores por condición) **p<0,01 prueba t de Student de dos colas.

1.3.2 Efecto sobre la perfusión y la oxigenación de los tumores

Análisis de secciones de tumores de ratones perfundidos con lectina-FITC indicaron que el tratamiento con Lov aumentaba el porcentaje de vasos sanguíneos con doble tinción lectina-FITC/CD31+ en comparación con los ratones vhcl (FIG. 11A-C). Por lo tanto, el tratamiento con Lov no solo incrementó el número total de vasos sanguíneos que irrigaban los tumores Tg-neu (Fig. 3), sino que también mejoró la funcionalidad de los mismos, resultando en una mayor perfusión de los tumores.

Consistente con el aumento en la perfusión, observamos que los tumores tratados con Lov tenían una mayor oxigenación comparado con el vhcl, determinada como una disminución del área teñida por el marcador de hipoxia pimonidazol (FIG. 12A, B). Una consecuencia del metabolismo glucolítico en tejidos hipóxicos es la acumulación de lactato (efecto Warburg). Observamos que la administración de Lov disminuyó los niveles de lactato en los tumores (FIG. 12C).

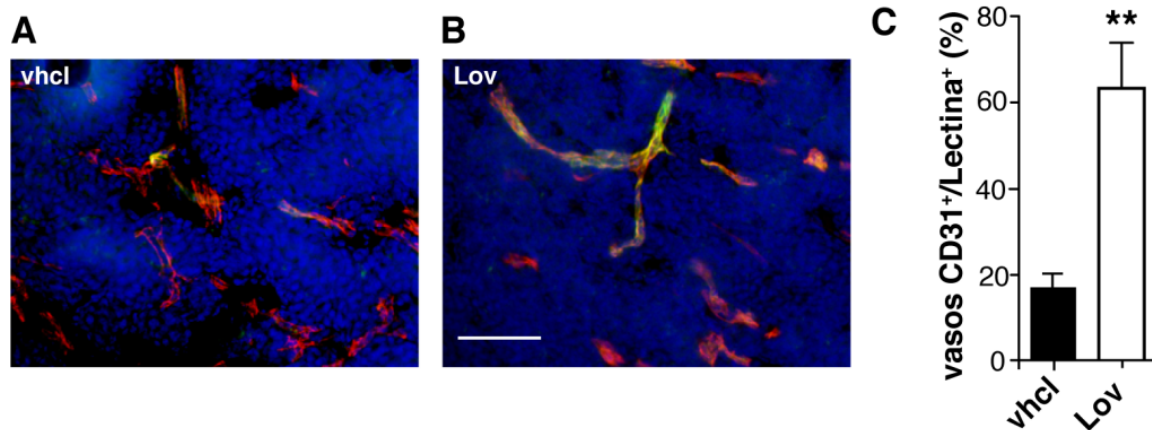


Figura 11. El tratamiento con lovastatina mejora la perfusión de los tumores. Inmunofluorescencia de secciones de tumores de ratones tratados con vhcl (A) y Lov (B) perfundidos con lectina-FITC y teñidos con un anticuerpo anti-CD31. C) Cuantificación de los vasos con doble tinción CD31⁺/lectin⁺ a partir de imágenes como A y B ($n \geq 30$ de al menos 3 tumores por condición) ** $p < 0,01$ prueba t de Student de dos colas.

En conjunto, los resultados mostrados indican que el tratamiento con Lov aumenta el número y mejora la maduración de los vasos que infiltran los tumores, lo que provoca una mayor perfusión de dichos tumores y una reducción de la hipoxia en los mismos.

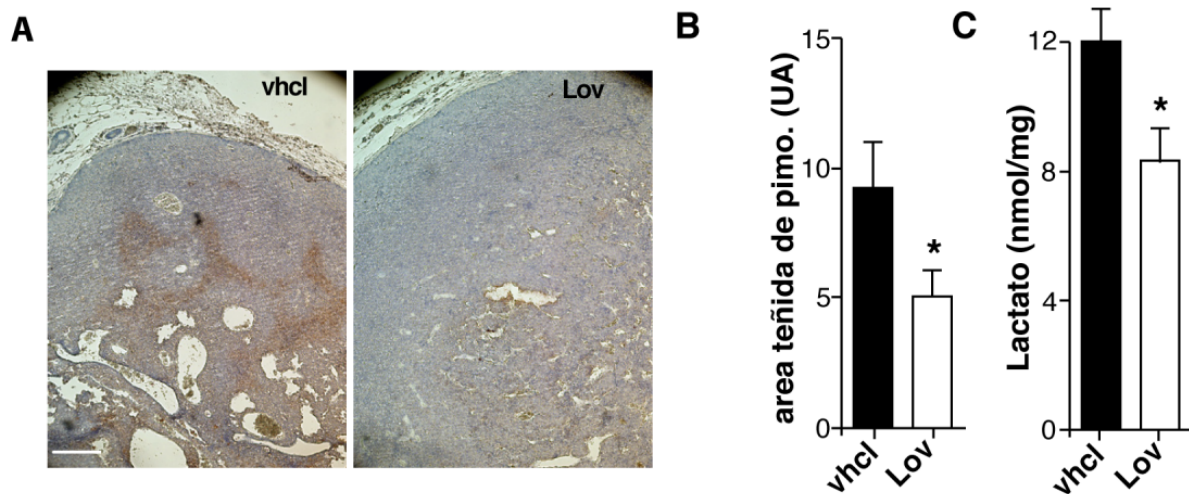


Figura 12. Lovastatina incrementa la oxigenación de tumores Tg-neu. A) Detección de zonas hipóxicas mediante tinción con pimonidazol. B) Cuantificación del área teñida con pimonidazol de las imágenes como A ($n \geq 5$ imágenes de al menos 4 tumores por grupo) * $p < 0,05$; test de Mann-Whitney. C) Concentración de lactato en tumores vhcl y Lov ($n = 5$ tumores/grupo; * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas).

1.4. El tratamiento con lovastatina aumenta el infiltrado de células T en el tumor

Numerosas observaciones experimentales derivadas de cultivos celulares, estudios con modelos animales y en pacientes demuestran que las estatinas tienen propiedades anti-inflamatorias (Jain MK y Ridker PM, 2005). Además está descrito que en determinados tipos de tumores, como melanoma, las estatinas pueden promover la respuesta inmune anti-tumoral (Sarrabayrouse et al., 2017). Dado que el tratamiento con Lov reduce la aparición de nuevos tumores en los ratones Tg-neu (FIG.1D), analizamos si Lov inducía cambios en la respuesta inmune.

Se analizó por citometría de flujo el infiltrado de las poblaciones mayoritarias de leucocitos en los tumores de ratones Tg-neu tratados con Lov o con vhcl. Observamos un aumento significativo en la población de linfocitos T y una reducción en los macrófagos asociados a tumor (TAM) en los ratones tratados con Lov (FIG. 13A). Un análisis más detallado demostró que el tratamiento con Lov aumentó específicamente la infiltración de células T CD8⁺ (FIG. 13B).

Los datos obtenidos por FACS se corroboraron mediante el análisis por inmunofluorescencia de secciones de tumores; de nuevo observamos que el tratamiento con Lov aumentaba el número de linfocitos T infiltrantes, lo que causa un cambio significativamente en la proporción de células CD3⁺/CD11b⁺ en dichos tumores (FIG. 13C, D).

1.5. La inhibición del crecimiento de tumores por lovastatina depende del sistema inmune adaptativo

El tratamiento con Lov no afecta al crecimiento de los tumores primarios en los ratones Tg-neu (FIG. 1B), pero sí inhibe la aparición de nuevos tumores en dichos ratones (Fig. 1D). Esto sugiere que Lov pudiera no ejercer efectos anti-tumorales en tumores ya establecidos, pero sí impedir el desarrollo de nuevas lesiones favoreciendo la eliminación de las mismas por el sistema inmune. Para mimetizar esta condición, generamos tumores mediante la inyección de células N202.1A, derivadas de un tumor de mama de ratones Tg-neu, en ratones singénicos inmunocompetentes (Tg-neu) e inmunodeficientes (FVB-RAG2^{-/-}); el tratamiento con Lov comenzó el mismo día de la inyección de las células tumorales. Observamos que Lov inhibió el crecimiento de los tumores N202.1A en los ratones inmunocompetentes, determinado tanto por el volumen del tumor (FIG. 9A) como por el peso final del mismo (FIG. 9B).

El análisis del infiltrado tumoral indicó que Lov aumentaba la infiltración de linfocitos T (**FIG. 14C**), lo que cambiaba la proporción de células CD3⁺/CD11b⁺ (**FIG. 14D**). Por el contrario, el crecimiento de los tumores N202.1A no se vió afectado por el tratamiento con Lov en los ratones FVB-RAG2^{-/-} (**FIG. 14E**). Estos resultados indican la existencia de una asociación entre la inhibición del crecimiento de los tumores N202.1A por Lov y el sistema inmune adaptativo.

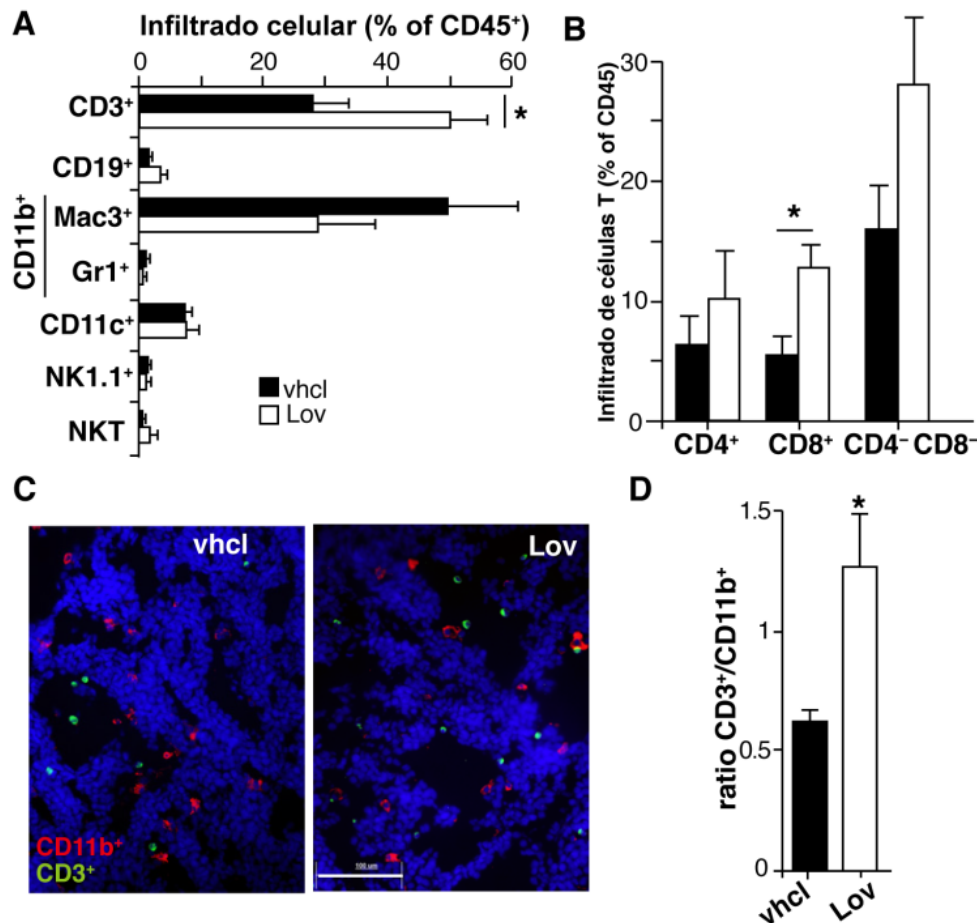


Figura 13. Lov aumenta la infiltración de células T en el tumor. A) Análisis por FACS del infiltrado leucocitario en los tumores Tg-neu tratados con vhcl o Lov. B) Porcentaje de subtipos de linfocitos T en los tumores analizados en A, ($n = 5$ ratones/condición). C) Imagen representativa de tumores teñidos con CD11b (células mieloides, rojo) y CD3 (células linfoides, verde); barra de escala = 100 μ m. D) Proporción de células mieloides y linfoides en imágenes como C ($n = 10$ imágenes de 2 tumores por condición). * $p < 0,05$ prueba t de Student de dos colas

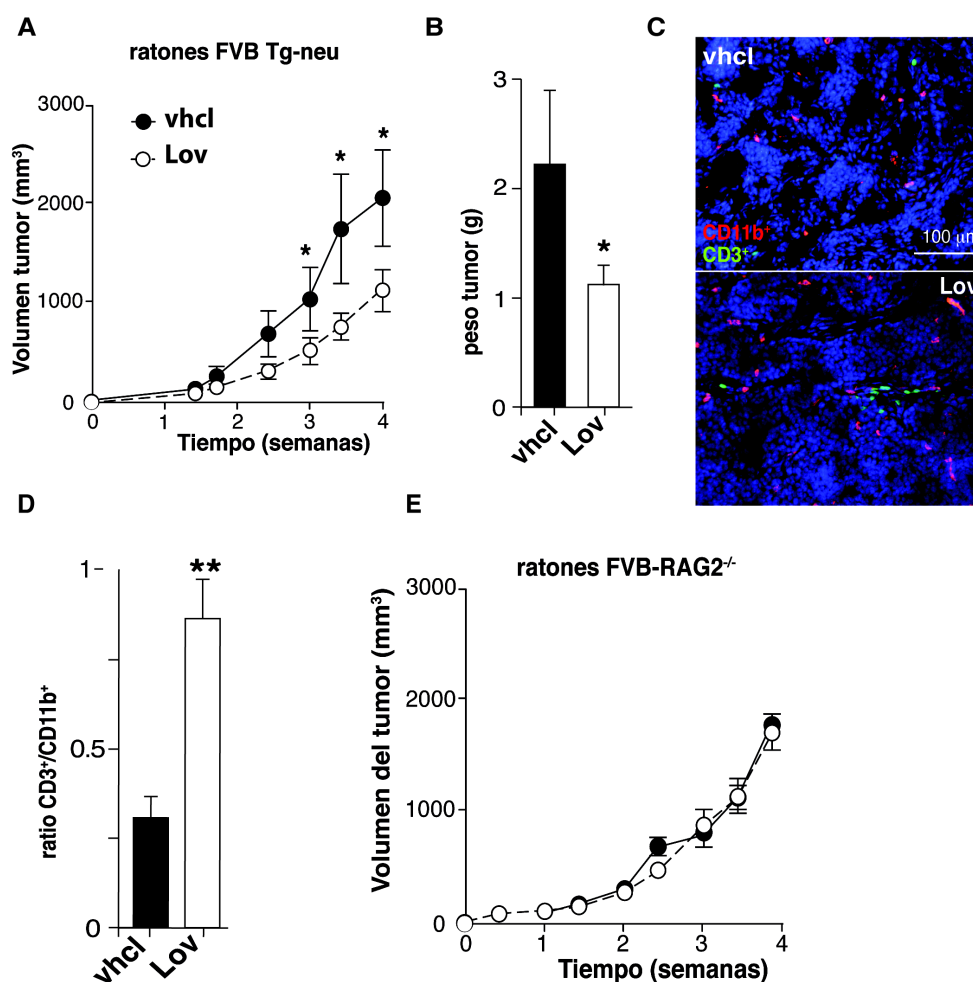


Figura 14. La lovastatina inhibe el crecimiento de tumores N202.1A en ratones inmunocompetentes pero no en ratones inmunodeficientes. A) Cinética de crecimiento de tumores N202.1A inducidos en ratones Tg-neu tratados con vhcl o Lov. B) Peso de los tumores después de sacrificar los ratones ($n = 9$ ratones/grupo). C) Secciones representativas de los tumores en B teñidos para CD11b (rojo) y CD3 (verde). D) Relación entre células CD3⁺ y CD11b⁺ a partir de las imágenes como C ($n = 6$ imágenes/grupo). E) Cinética de crecimiento de tumores N202.1A implantados en ratones Rag2^{-/-} inmunodeficientes tratados con vhcl o Lov ($n = 8$ ratones/grupo). A, B, D, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, prueba t de Student de dos colas.

2. El tratamiento con lovastatina induce un programa genético que afecta a la angiogénesis y a la respuesta inflamatoria

Nuestros datos demuestran que Lov induce cambios en la estructura y función de la red vascular tumoral, así como en el tipo de infiltrado leucocitario. Con el fin de identificar el mecanismo a través del cual Lov induce estos cambios, realizamos un análisis global de los perfiles de expresión génica de los tumores tratados con Lov y vhcl. Se identificaron 88 genes con expresión diferencial (≥ 2 veces de cambio; $p < 0.002$), de los cuales 39 genes presentaban expresión aumentada (TABLA 8) y 49 expresión disminuida en los tumores tratados con Lov en relación a los vhcl (TABLA 9). Seleccionamos 28 de estos genes para validar su expresión mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR) en un set de 6 tumores independientes para cada tratamiento; el 75% de los genes positivamente regulados y el

95% de los genes negativamente regulados por lovastatina fueron validados (TABLAS 8 y 9).

TABLA 8: Genes regulados positivamente por lovastatina en tumores Tg-neu

ID	Símbolo del gen	Variación (Affymetrix)	p-valor	Variación (RT-qPCR)
1452893_s_at	1110065P19Rik	+3.37	0.00883930	
1428739_at	2310040A07Rik	+2.96	0.00960771	
1453456_at	2900084O13Rik	+2.04	0.01848227	
1457671_at	9330120H11Rik	+2.13	0.00487482	
1455338_at	A4galt	+2.01	0.01611295	
1434450_s_at	Adrbk2	+2.55	0.00570424	n.d.
1451528_at	BC025833	+2.28	0.01880700	
1436789_at	Ccnjl	+2.63	0.00942679	
1417649_at	Cdkn1c	+3.02	0.01218819	+3.53
1444318_at	Chchd7	+2.19	0.00310487	
1425400_a_at	Cited4	+2.16	0.01646017	+2.23
1456877_at	Duox1	+2.14	0.01192997	n.d.
1448507_at	Efh1	+5.29	0.01176520	
1418569_at	Fblim1	+2.22	0.00649830	
1427443_at	Igkv14-111	+2.17	0.00188028	
1442368_at	Kctd12b	+2.42	0.01312430	
1425078_x_at	LOC620078	+2.94	0.01014131	
1418061_at	Ltbp2	+2.10	0.01061443	
1419127_at	Npy	+12.58	0.00003405	+12.56
1417526_at	Pcbp3	+2.23	0.00478482	
1452398_at	Plce1	+2.32	0.00628965	
1449876_at	Prkg1	+2.45	0.01325143	
1428268_at	Psd2	+2.96	0.00005402	
1455359_at	Ptpn14	+2.22	0.01009810	
1451362_at	Rab711	+2.26	0.00177939	
1424256_at	Rdh12	+5.77	0.00676982	+3.91
1440523_at	Rdhe2	+2.25	0.01861623	
1443832_s_at	Sdpr	+2.26	0.00851791	
1455506_at	Slc25a34	+2.25	0.01219438	
1428642_at	Slc35d3	+3.93	0.00158635	
1418706_at	Slc38a3	+2.14	0.01906393	
1460129_at	Slc6a2	+15.35	0.00083798	+10.68
1417633_at	Sod3	+3.08	0.01821658	+2.90
1430567_at	Spink5	+2.56	0.01232634	
1423707_at	Tmem50b	+2.74	0.00022938	
1419063_at	Ugt8a	+2.16	0.00361589	
1420955_at	Vsnl1	+2.65	0.00312430	
1425098_at	Zfp106	+2.03	0.00058966	
1449314_at	Zfpm2	+2.14	0.00506179	

n.d., no-detectado

TABLA 9: Genes regulados negativamente por lovastatina en tumores Tg-neu

ID	Símbolo del gen	Variación (Affymetrix)	p-valor	Variación (RT-qPCR)
1424518_at	2310016F22Rik	-2.23	0.00519226	
1435639_at	2610528A11Rik	-3.83	0.01165076	
1450387_s_at	Ak3l1	-3.14	0.00849934	
1418133_at	Bcl3	-2.11	0.00256045	
1422470_at	Bnip3	-2.25	0.00113680	n.d.
1423954_at	C3	-2.44	0.01987239	
1436194_at	C330008K14Rik	-2.07	0.00780316	
1421307_at	Car13	-2.15	0.01587732	-2.51
1417268_at	Cd14	-2.60	0.01686902	
1434376_at	Cd44	-2.29	0.00908860	
1423233_at	Cebpd	-2.70	0.00184921	
1451537_at	Chi3l1	-4.24	0.00354754	-4.78
1460259_s_at	Clca1	-11.98	0.00154993	-18.53
1455232_at	Cml2	-2.01	0.00836423	
1448792_a_at	Cyp2f2	-2.57	0.01026088	-11.57
1459725_s_at	Dcpp1	-24.80	0.00645913	-30.33
1434580_at	Enpp4	-2.54	0.00837424	
1419029_at	Ero1l	-3.52	0.00262414	-2.91
1416411_at	Gstm2	-3.86	0.01805969	-4.86
1422704_at	Gyk	-2.11	0.01194332	-2.57
1418645_at	Hal	-2.04	0.00324816	
1438037_at	Herc5	-2.24	0.00302848	
1424018_at	Hint1	-2.15	0.00847301	
1448239_at	Hmox1	-2.64	0.01799435	-2.89
1426278_at	Ifi27	-3.54	0.00005370	
1450783_at	Ifit1	-2.44	0.00001674	-2.81
1418293_at	Ifit2	-2.38	0.00026362	
1449025_at	Ifit3	-2.84	0.00001199	-3.4
1423754_at	Ifitm3	-2.30	0.00070483	
1447456_x_at	LOC671351	-3.81	0.01337311	
1426808_at	Lgals3	-3.54	0.01109253	
1417290_at	Lrg1	-4.80	0.01397624	
1438239_at	Mid1	-2.05	0.01598880	
1417256_at	Mmp13	-2.25	0.00898137	-3.62
1449587_a_at	Muc10	-5.86	0.01043032	
1451905_a_at	Mx1	-2.51	0.00174636	-4.0
1450977_s_at	Ndrp1	-2.35	0.00060994	-3.05
1420760_s_at	Ndr1	-3.58	0.00088923	
1416432_at	Pfkfb3	-2.08	0.01154500	-2.32
1418471_at	Pgf	-2.75	0.00572188	-2.86

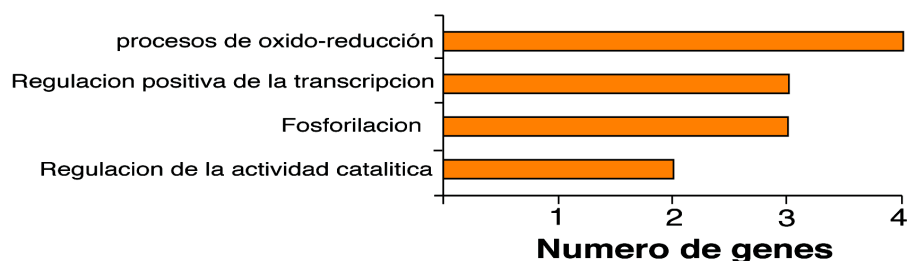
1449184_at	Pglyrp1	-4.14	0.00740642	
1437893_at	Plb1	-3.10	0.00735658	
1420388_at	Prss12	-2.01	0.01183608	
1436058_at	Rsad2	-3.14	0.00005334	-3.32
1419100_at	Serpina3n	-2.01	0.00399102	
1415802_at	Slc16a1	-2.82	0.00295649	
1416342_at	Tnc	-2.85	0.01224459	-3.73
1418345_at	Tnfsf13	-2.68	0.01093668	-2.81
1418191_at	Usp18	-3.04	0.00076537	

n.d., no-detectado

Los procesos biológicos que estaban significativamente regulados por el tratamiento con Lov se analizaron usando la base de datos Gene Ontology (GO) (FIG. 15A, B). En concordancia con el efecto que produce Lov en los tumores, encontramos que hay cambios en la expresión de genes relacionados con procesos de oxido/reducción, disminución en la expresión de genes reguladores positivos de la angiogénesis así como represión de genes relacionados con la respuesta inmune innata.

A

Vías inducidas por Lov



B

Vías reprimidas por Lov

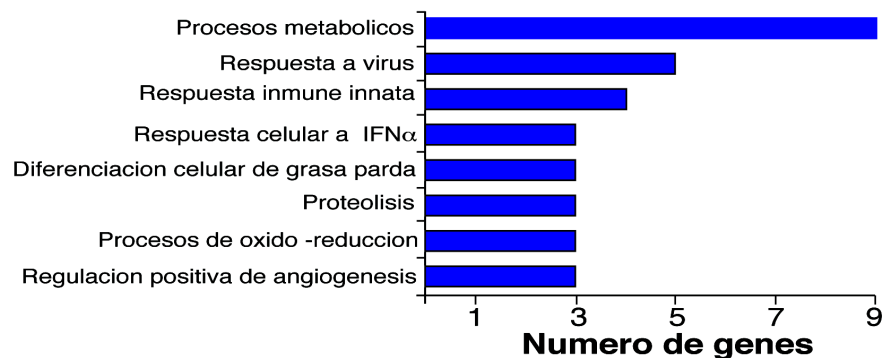


Figura 15. A, B) Análisis por *gene ontology* (GO) de los principales procesos biológicos significativamente inducidos (A) o reprimidos (B) por el tratamiento con Lov (FDR <0,05).

2.1. La lovastatina inhibe la expresión del PIGF, un mediador de la polarización de los macrófagos en el tumor y la angiogénesis

Uno de los genes que aparecía negativamente regulado por Lov en el análisis por microarray era el factor del crecimiento placentario (PIGF; placental growth factor), cuyo aumento se asocia con la hiperactivación de la vasculatura tumoral (Fischer et al., 2007). Esta disminución fue validada por qPCR (TABLA 9) y por ELISA (FIG. 16A). El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; vascular endothelial growth factor) es también un elemento clave en el proceso de angiogénesis tumoral (Arjaans et al., 2016) y observamos que los niveles de ARNm de VEGF eran comparables en los tumores vhcl y en los tratados con Lov (FIG. 16B), sugiriendo cierto grado de especificidad en el efecto de Lov sobre genes relacionados con la angiogénesis.

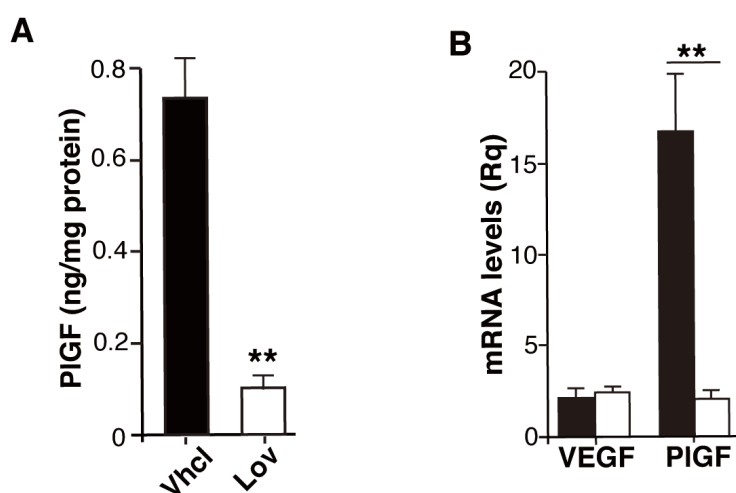


Figura 16. El tratamiento con Lov reduce los niveles de PIGF pero no de VEGF en tumores Tg-neu. A) Niveles de PIGF en extractos tumorales de ratones Tg-neu tratados con vhcl o Lov ($n = 6$ tumores/ grupo). (B) Niveles de ARNm de VEGF y PIGF en tumores de ratones tratados con vhcl o Lov ** $p < 0,01$, prueba t de Student de dos colas.

Se ha sugerido que el PIGF incrementa la angiogénesis tumoral induciendo la polarización de los macrófagos tumorales (TAM; *tumor associated macrophages*) hacia un fenotipo M2, que promueve el crecimiento tumoral, la secreción de factores proangiogénicos y la supresión de la función efectora de células T (Rolny et al., 2011). Debido a que el tratamiento con Lov regula negativamente PIGF, se analizaron los marcadores M1 y M2 de los TAM que infiltraban los tumores. Observamos que el tratamiento con Lov aumentó significativamente los niveles de ARNm de los marcadores M1 (IFN γ e IL-1 β), mientras que indujo una regulación negativa de los marcadores M2 (IL-10, CD206 y CCL22) (FIG. 17A). El tratamiento con Lov también redujo los niveles de ARNm de TNF α (FIG. 17A), lo que coincide con la menor infiltración de TAM que observamos en estos tumores.

También observamos en secciones de tumores que el tratamiento con Lov disminuyó el porcentaje de TAM con fenotipo M2, identificados como CD206⁺, respecto al número total de macrófagos identificados con el marcador F4/80⁺. (FIG. 17B, C).

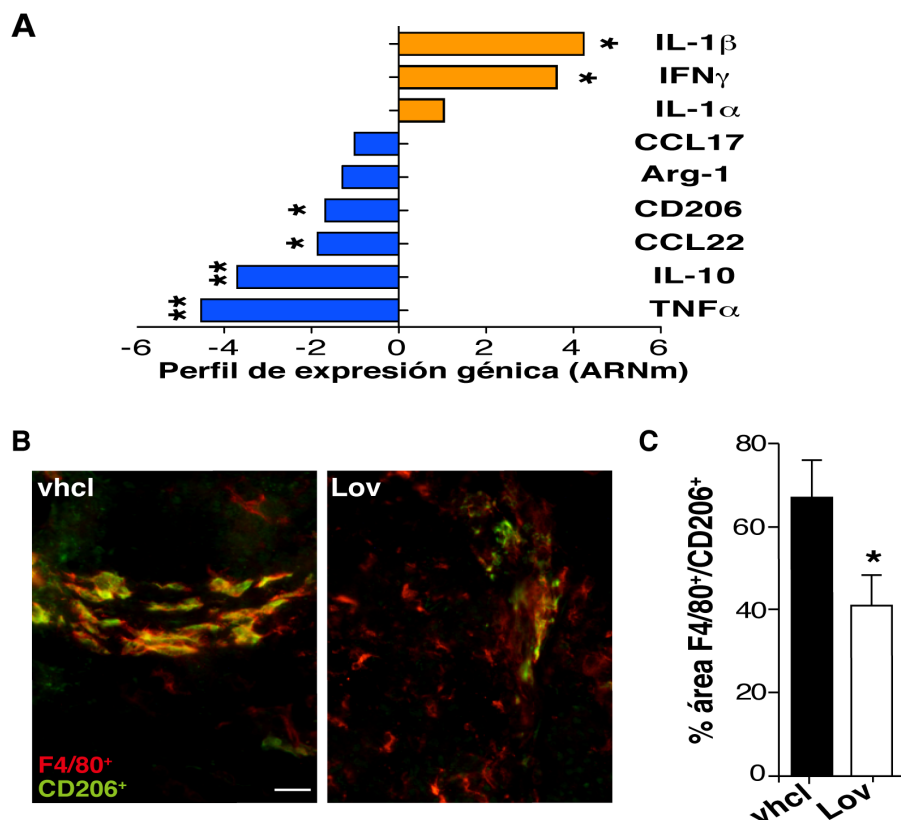


Figura 17. La lovastatina reduce la polarización de TAM hacia fenotipo M2. A) Inducción o represión mediada por Lov del ARNm de los marcadores M1 (amarillo) y M2 (azul) de células CD45⁺ aisladas de tumores. Los valores indican la expresión relativa en tumores tratados con Lov respecto vhcl; se representa la variación media en la expresión de ARNm de al menos 4 tumores/grupo. B) Secciones representativas de tumores Tg-neu en ratones tratados con vhcl y Lov teñidos con el marcador M2 CD206 (verde) y el marcador de macrófagos F4/80 (rojo); barra de escala= 20 μ m. C) Cuantificación de TAM M2 (F4/80⁺/CD206⁺) en imágenes como B (n = 20 imágenes de 3 tumores/grupo)* p <0,05, ** p <0,01, prueba t de Student de dos colas.

Por tanto la reducción de PIGF mediada por Lov se asocia con una menor polarización de los TAM hacia fenotipo M2, lo que puede, por una parte, mejorar la vascularización tumoral y, por otra parte, generar un microambiente más propicio para la inmunidad mediada por células T.

2.2. La lovastatina induce la expresión de la Superóxido Dismutasa 3 (SOD3) en el microambiente tumoral

Uno de los genes que aparecía positivamente regulado por Lov era la Superóxido Dismutasa 3 (SOD3), una enzima negativamente regulada en algunos tipos de cáncer respecto al tejido sano (Cammarota et al. 2015); la inducción de la SOD3 por Lov podría tener por tanto un potencial interés terapéutico.

En primer lugar observamos que, comparado con el tejido mamario sano, los tumores Tg-neu expresan menor cantidad de la SOD3 a nivel de ARNm y proteína, tal y como ha sido reportado en humanos (Singh y Bhat, 2012; Svensk et al., 2004; Wheeler et al., 2003; Cammarota et al., 2015; Teoh-Fitzgerald et al., 2014). También validamos tanto a nivel de ARNm (**FIG. 18A**) como a nivel de proteína (**FIG. 18B**) la inducción en la expresión de la SOD3 por Lov en tumores; en el tejido mamario no tumoral, dicha inducción era marginal. Para determinar qué células del microambiente tumoral eran responsables de la inducción de la SOD3 por Lov, se analizaron los niveles de ARNm de la SOD3 en células tumorales (fracción CD24⁺), células endoteliales (fracción CD31⁺) y células hematopoyéticas (fracción CD45⁺) purificadas del parénquima tumoral (Tardaguila et al., 2013). Lov aumentó la expresión de la SOD3 en todos los tipos celulares estudiados, pero ya que la expresión en las células CD45⁺ es mucho menor que en el resto la contribución al aumento global de SOD3 en el tumor se debe al efecto sobre las células tumorales y endoteliales (**FIG. 18C**). Esto se confirmó al analizar la SOD3 en secciones de tumores y de tejido sano mamario, en las que quedó patente el fuerte silenciamiento de la SOD3 en tumores (comparado con el tejido sano) y la inducción de su expresión con Lov cerca de algunos vasos sanguíneos (**FIG. 18D**).

Estos resultados nos animaron a investigar acerca de la contribución de la SOD3 a los efectos producidos por la lovastatina sobre la estructura y función de los vasos sanguíneos tumorales, así como sobre el infiltrado leucocitario de los tumores.

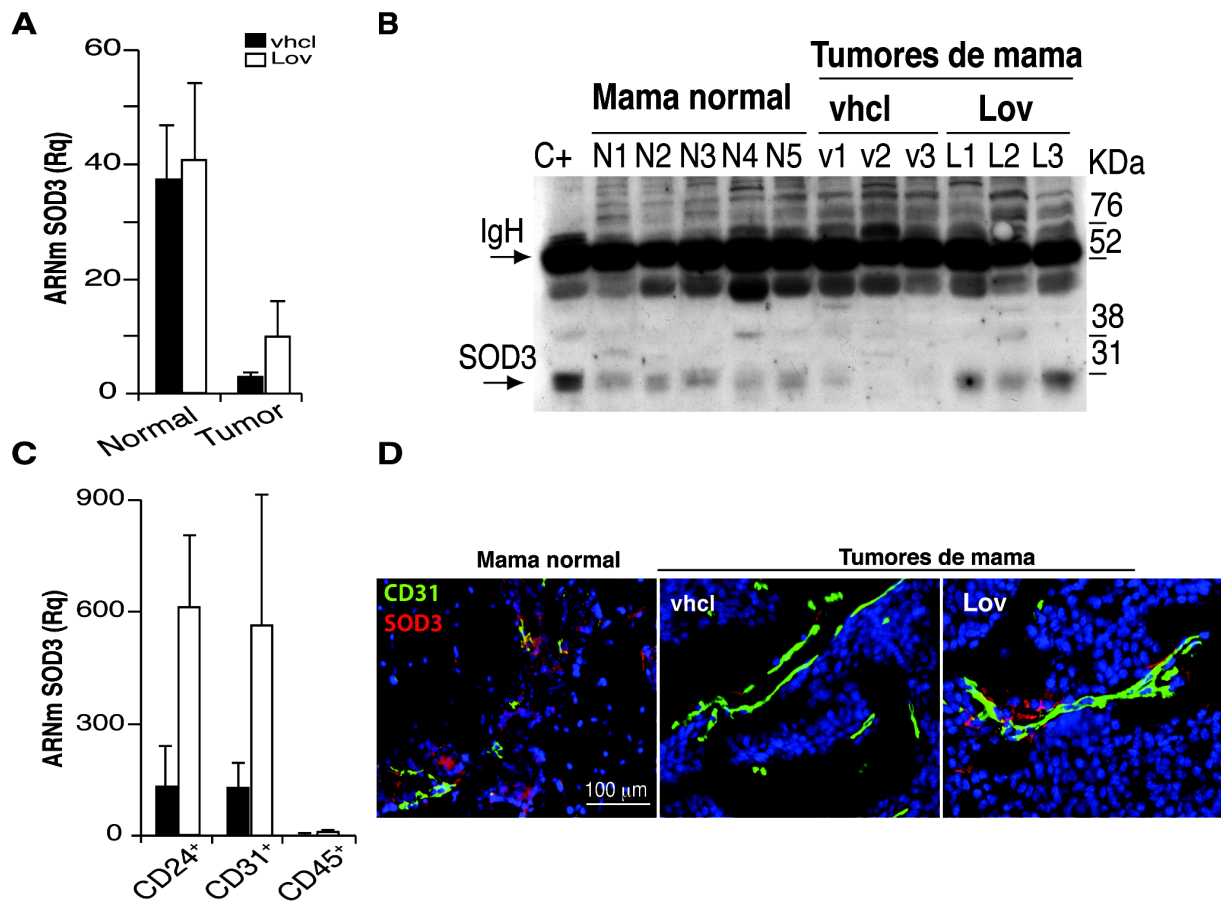


Figura 18. Identificación de la SOD3 como un gen que aumenta su expresión por el tratamiento con Lov en tumores Tg-neu. A) Niveles relativos de ARNm de la SOD3 en glándulas mamarias sanas (normal) y tumores de mama de ratones Tg-neu tratados con vhcl y Lov (n=6 ratones/condición). B) Inmunoblot representativo de la SOD3 en extractos de tejido normal y tumores de ratones tratados con vhcl y Lov (n=6 tumores/condición). C+= extracto de pulmón como control positivo de SOD3; la cadena pesada de la Ig se usó como control de carga. C) Cuantificación del ARNm relativo de la SOD3 en células CD24⁺, CD31⁺ y CD45⁺ aisladas de tumores vhcl y Lov (n=4). D) Tinción de SOD3 (rojo) y CD31 (verde) en secciones de tumores de ratones tratados con vhcl o Lov y en tejido normal (n = 20 imágenes por condición).

3. SOD3 contribuye a los efectos de la Lovastatina sobre la vasculatura y sobre el infiltrado tumoral

La SOD3 disminuye los niveles de ROS, tales como O_2^- y H_2O_2 y aumenta de forma indirecta la biodisponibilidad del NO. A través de la regulación de estas especies reactivas del oxígeno ejerce un importante papel en la remodelación de la vasculatura (Kashiwagi et al., 2008), así como en la migración de las células inflamatorias (Laurila et al., 2009).

3.1. Efecto sobre la quimioterapia

Para estudiar la relevancia de la SOD3 en los efectos inducidos por Lov, se inyectó de forma subcutánea la línea celular tumoral LLC (*Lewis lung carcinoma*) en ratones silvestres (*wild type*; WT) y en ratones deficientes en la SOD3 ($SOD3^{-/-}$), ambos en fondo genético C57BL/6. Una vez que los tumores fueron detectados (150-200 mm³), los ratones fueron tratados diariamente con Lov o vhcI, con o sin Doxo (2,5 mg/Kg) siguiendo la misma pauta y dosis que en los ratones Tg-neu. El tratamiento con Lov aumentó los niveles de ARNm (FIG. 19A) y de la proteína de la SOD3 (FIG. 19B, C) en los tumores LLC implantados en ratones WT; esto no se observó en los ratones $SOD3^{-/-}$.

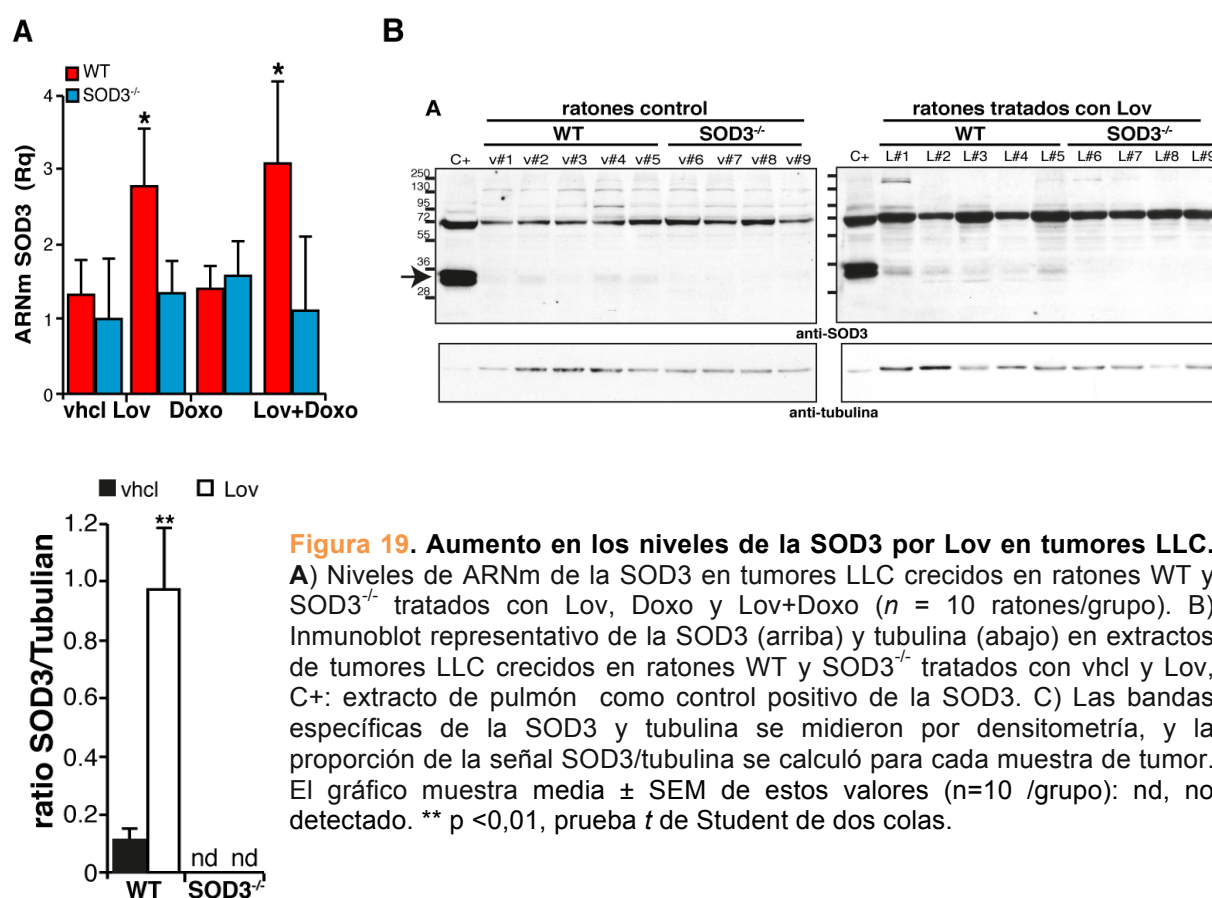


Figura 19. Aumento en los niveles de la SOD3 por Lov en tumores LLC.

A) Niveles de ARNm de la SOD3 en tumores LLC crecidos en ratones WT y $SOD3^{-/-}$ tratados con Lov, Doxo y Lov+Doxo ($n = 10$ ratones/grupo). **B)** Inmunoblot representativo de la SOD3 (arriba) y tubulina (abajo) en extractos de tumores LLC crecidos en ratones WT y $SOD3^{-/-}$ tratados con vhcI y Lov, C+: extracto de pulmón como control positivo de la SOD3. **C)** Las bandas específicas de la SOD3 y tubulina se midieron por densitometría, y la proporción de la señal SOD3/tubulina se calculó para cada muestra de tumor. El gráfico muestra media \pm SEM de estos valores ($n=10$ /grupo): nd, no detectado. ** $p < 0,01$, prueba t de Student de dos colas.

Dado que las células LLC codifican para la SOD3, estos resultados indicaron que Lov inducía la expresión de esta proteína principalmente en el estroma y no en la fracción de células tumorales.

Se analizó la cinética de crecimiento de estos tumores y se observó que independientemente de la SOD3, la administración de Lov no afectó al crecimiento tumoral (**FIG. 20A, B**). Sin embargo, la coadministración de Lov + Doxo (2,5 mg/Kg) redujo el crecimiento de los tumores sólo en ratones WT (**FIG. 20A**) y no en ratones SOD3^{-/-} (**FIG. 20B**). Este efecto se correlacionó con un incremento en los niveles de Doxo sólo en los tumores de ratones WT tratados con Lov en comparación con los tumores de ratones WT vhcl (**FIG. 20C**).

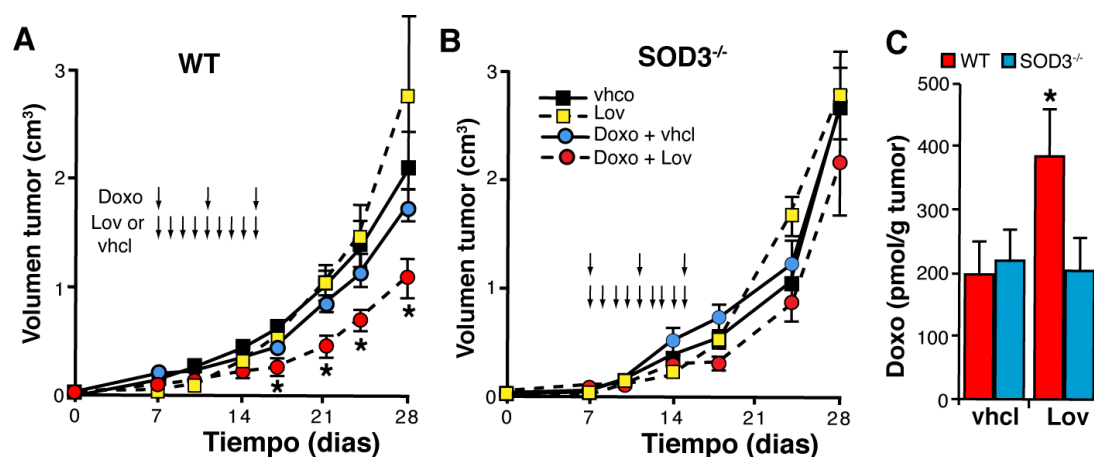


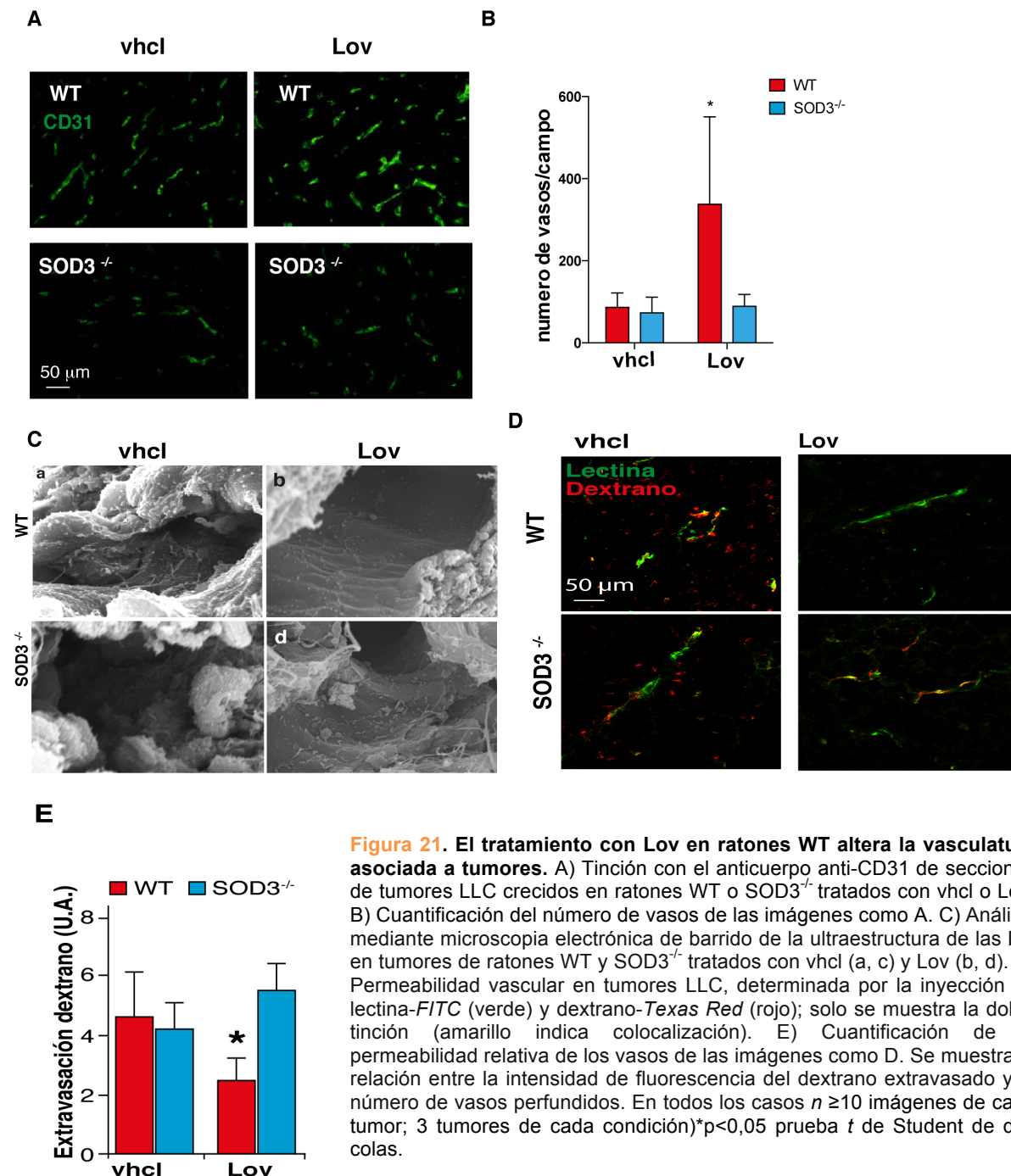
Figura 20. Mejora de la quimioterapia por Lov sólo en ratones WT. Cinética de crecimiento de tumores LLC en ratones WT (A) y SOD3^{-/-} (B) tratados con vhcl, Doxo+vhcl o Doxo+Lov. (n=10 ratones/condición). *p < 0,05, prueba *one-way* ANOVA, usando test de Dunnett refiriendo al grupo vhcl. C) Cuantificación de Doxo en extractos de tumores de los ratones en A y B. *p < 0,05, prueba *t* de Student de dos colas.

3.2. Efecto sobre la estructura y permeabilidad de la red vascular tumoral

El incremento en la cantidad de Doxo en los tumores puede ser consecuencia de cambios mediados por la SOD3 en la red vascular que irriga el tumor. Apoyando esta hipótesis observamos que la administración de Lov aumentó el número de vasos sanguíneos, identificados como el número de estructuras CD31⁺, sólo en los ratones WT pero no en los ratones SOD3^{-/-} (**FIG. 21A y B**).

El análisis ultraestructural indicó que los vasos de los tumores de ratones WT vhcl así como de ratones SOD3^{-/-} presentaban anomalías típicas de una vasculatura tumoral, como discontinuidades en las conexiones entre las células endoteliales (**FIG. 21C-a, -c y -d**).

Por el contrario, el tratamiento con Lov de ratones WT potenció la unión entre células endoteliales, aportando una estructura continua a los vasos (**FIG.21C–b**), algo que no ocurría en los ratones $SOD3^{-/-}$. Consistente con estos cambios estructurales, el tratamiento con Lov redujo la extravasación de dextrano-Texasred en tumores crecidos en ratones WT pero en los ratones $SOD3^{-/-}$ tratados con Lov, los cuales mostraron una permeabilidad comparable al del grupo vhcl (**FIG. 21D, E**).



La permeabilidad de los vasos sanguíneos está regulada en parte por las uniones adherentes célula-célula, uno de cuyos principales componentes es la cadherina del endotelial vascular (VEC) (Dejana et al., 2008).

Analizamos si el tratamiento con Lov regulaba los niveles de VEC, y si la SOD3 mediaba en esta regulación. Observamos que los niveles de VEC (ARNm y proteína) eran más elevados en los tumores de ratones WT tratados con Lov en comparación con los vhcl o los ratones SOD3^{-/-} (FIG. 22A, B, C). Estos resultados sugieren que el tratamiento con Lov regula la expresión de VEC en las células endoteliales del tumor de una manera dependiente de la SOD3.

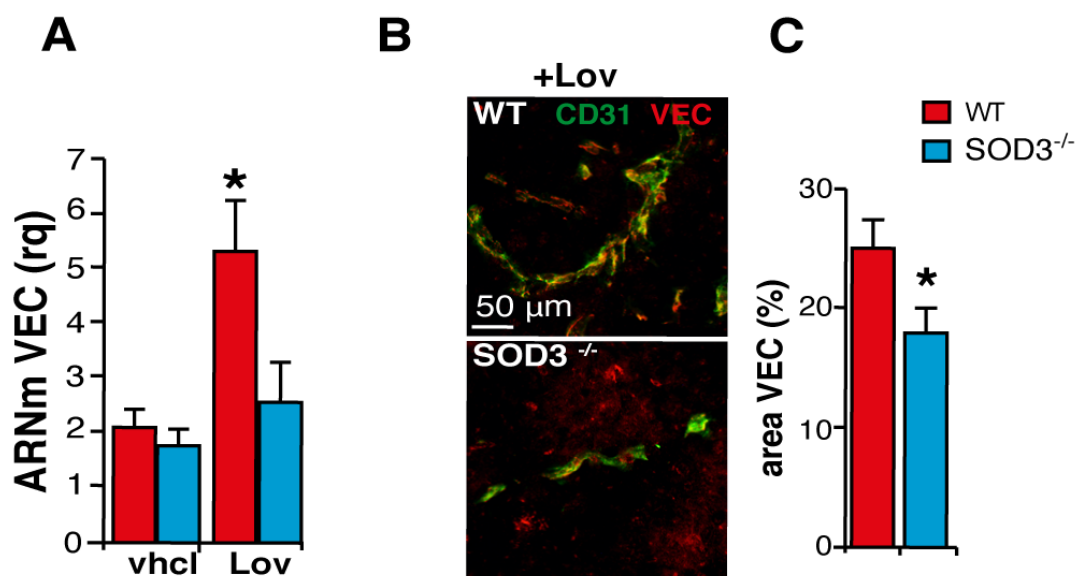


Figura 22. Inducción en los niveles de la VEC por Lov en ratones WT. A) Niveles de ARNm de VEC en tumores de ratones WT y SOD3^{-/-} tratados con vhcl y Lov. B) Imágenes de la tinción de VEC (rojo) y CD31 (verde) en tumores de ratones WT y SOD3^{-/-} tratados con Lov. C) Área teñida con VEC determinada como porcentaje de tinción de VEC en estructuras CD31⁺, de las imágenes como B. n=10 imágenes de 5 ratones/grupo, * p <0,05 prueba t de Student de dos colas.

3.3. Efecto sobre la infiltración de linfocitos T

En los tumores LLC se analizó también la infiltración de células T (CD3⁺) y de células mieloides (CD11b⁺) mediante inmunohistoquímica. Observamos un aumento específico en la infiltración de linfocitos T, pero no de células mieloides, en ratones WT tratados con Lov; como consecuencia la proporción CD3⁺/CD11b⁺ era mayor en los tumores tratados con Lov que en los tratados con vhcl (FIG. 23A, B). Sin embargo, el tratamiento con Lov en ratones SOD3^{-/-} no afectó al número de células CD3⁺ y CD11b⁺ que infiltraban los tumores (FIG. 23A, B), sugiriendo que el aumento en la infiltración de células T CD3⁺ por el tratamiento con Lov está mediado por la SOD3.

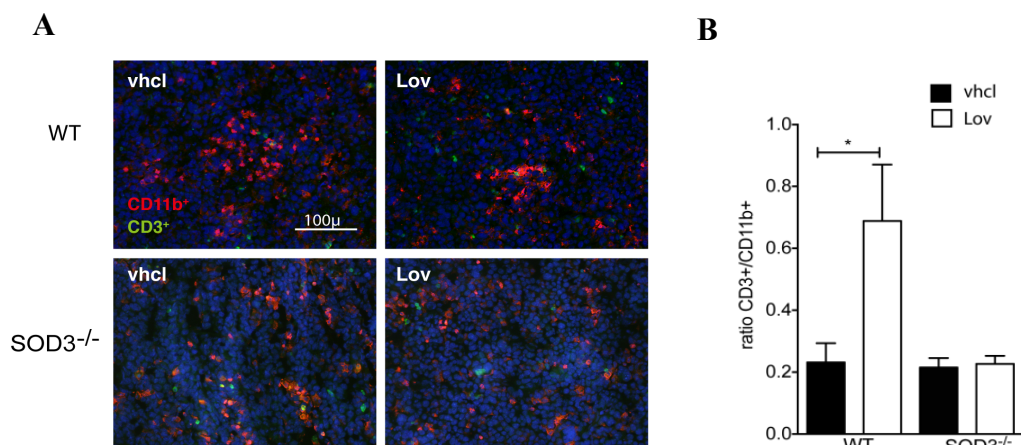


Figura 23. Aumento de la infiltración de linfocitos T en el tumor por tratamiento con Lov en ratones WT. A) Secciones representativas de los tumores LLC de ratones WT y SOD3^{-/-} tratados con vehcl y Lov teñidos para CD11b (rojo) y CD3 (verde). B) Proporción de células CD3⁺/CD11b⁺ en imágenes como A * p < 0,05 prueba t de Student de dos colas.

En conjunto estos resultados identifican a la SOD3 como un mediador indispensable de la actividad de la lovastatina sobre la función vascular del tumor y la infiltración de linfocitos T en el parénquima.

4. SOD3 regula la expresión de VE-cadherina

Las estatinas tienen efectos pleiotrópicos sobre la vasculatura y sobre las células tumorales independientemente de la inducción de la SOD3 (Mira y Mañes, 2009). Ya que los niveles de la SOD3 están disminuidos en tumores, diseñamos una estrategia experimental para restaurar dichos niveles en el microambiente tumoral mediante adenovirus recombinantes. Esto nos permitió analizar el papel preciso de la SOD3 en los procesos arriba descritos, sin los posibles efectos colaterales de la lovastatina.

4.1. La inducción de la SOD3 aumenta la acumulación de doxorrubicina en el tumor

Para disociar el efecto de la SOD3 de otros efectos de Lov, indujimos la expresión de la SOD3 por inyección intratumoral de adenovirus recombinantes (Ad-mSOD3) en tumores LLC crecidos en ratones SOD3^{-/-}. Como control, inyectamos adenovirus recombinantes que codifican para β -galactosidasa (Ad-C). Verificamos por inmunohistoquímica que la inyección del Ad-mSOD3 aumentaba los niveles de la SOD3 en el parénquima tumoral (FIG. 24C). La sobreexpresión de la SOD3 no afectó a la cinética de crecimiento de los tumores, la cual era comparable entre los dos grupos (Ad-mSOD3 y Ad-C), sugiriendo que la SOD3, por si misma, no afecta al crecimiento tumoral (FIG. 24A).

Sin embargo, la inyección de Ad-mSOD3, pero no de Ad-C, potenció el efecto antitumoral de una dosis subóptima de Doxo (FIG. 24D). Este efecto se correlacionó con un aumento en los niveles de Doxo en los tumores inyectados con Ad-mSOD3 (FIG. 24E).

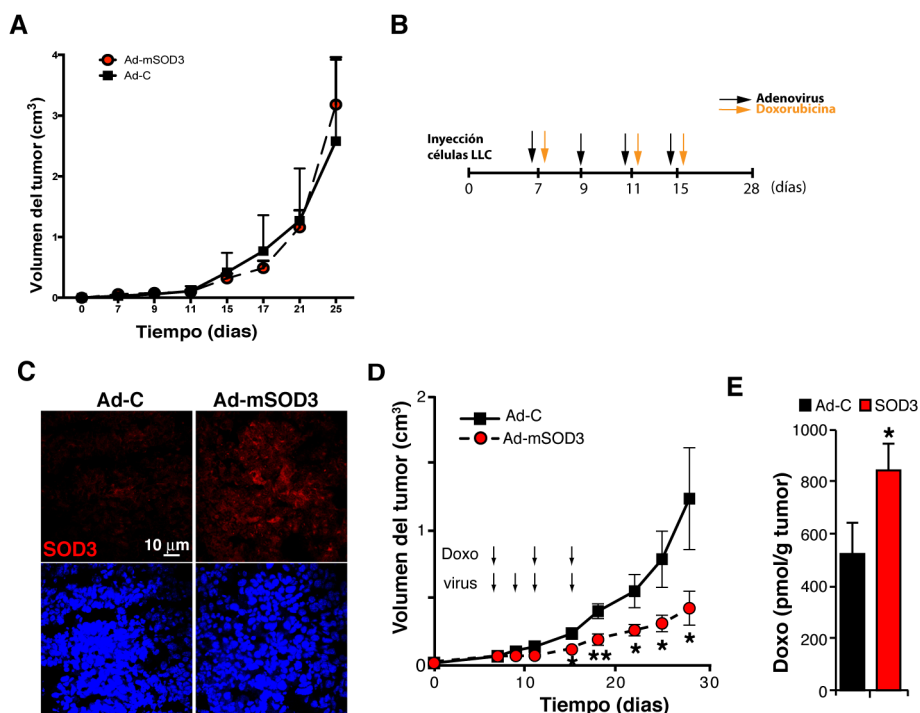


Figura 24. La inducción intratumoral de la SOD3 mejora la quimioterapia. A) Cinética de crecimiento de los tumores LLC inyectados con Ad-C- o Ad-mSOD3 (n=9/grupo). B) Esquema del tratamiento con adenovirus en combinación con Doxo. C) Detección de la expresión de SOD3 (rojo) en secciones de tumores LLC inyectados con Ad-C y Ad-mSOD3; tinción nuclear con DAPI (azul) (n=15 imágenes/grupo). D) Cinética de crecimiento de los tumores LLC inyectados con Ad-C- o Ad-mSOD3 y tratados con Doxo (2,5 mg/Kg) (n=9/grupo). E) Cuantificación de Doxo en los extractos de tumores. * p <0.05, ** p <0.01, prueba t de Student de dos colas.

4.2. SOD3 regula la estructura de los vasos y aumenta la perfusión de los tumores

Analizamos en este modelo, si el aumento directo de la SOD3 en el tumor tiene algún efecto sobre el número y arquitectura de los vasos. Observamos que el tratamiento con Ad-mSOD3 redujo la densidad de estructuras CD31⁺ en el tumor (contrariamente a lo que ocurría con el tratamiento con Lov), pero estas eran más grandes que en los tumores inyectados con Ad-C (FIG. 25A, B, C). Además de alterar la estructura, la inyección de Ad-mSOD3 generó un aumento en la perfusión de los tumores, ya que se detectó un incremento en el porcentaje de vasos sanguíneos CD31⁺ marcados con lectina-FITC (FIG. 26A, B). Anteriormente expusimos que la VEC es una de las proteínas más importantes en la regulación de la permeabilidad de los vasos.

Analizamos por tanto, si la inyección directa de la SOD3 en el tumor regulaba los niveles de esta proteína en las células endoteliales asociadas al tumor. Encontramos que la inoculación del Ad-mSOD3 aumentó los niveles de VEC en el endotelio tumoral comparado con los niveles de los inyectados con Ad-C (**FIG. 26C**).

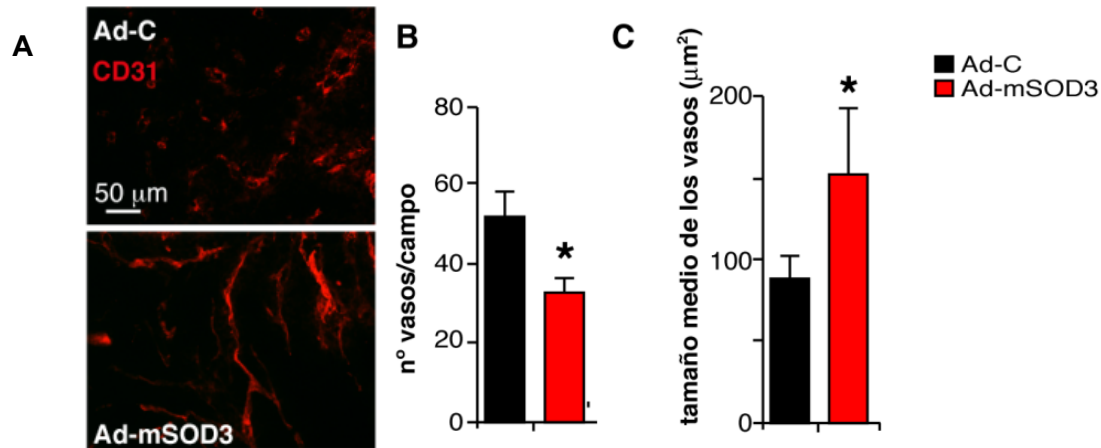


Figura 25. SOD3 reduce la densidad y aumenta el tamaño de los vasos. A) Tinción de CD31 (rojo) en secciones de tumores LLC inyectados con Ad-C y Ad-mSOD3. B) Cuantificación de la densidad de las estructuras CD31⁺ a partir de la tinción mostrada en A. C) Tamaño medio de las estructuras CD31⁺ a partir de las imágenes como A. * $p < 0.05$, prueba t de Student de dos colas.

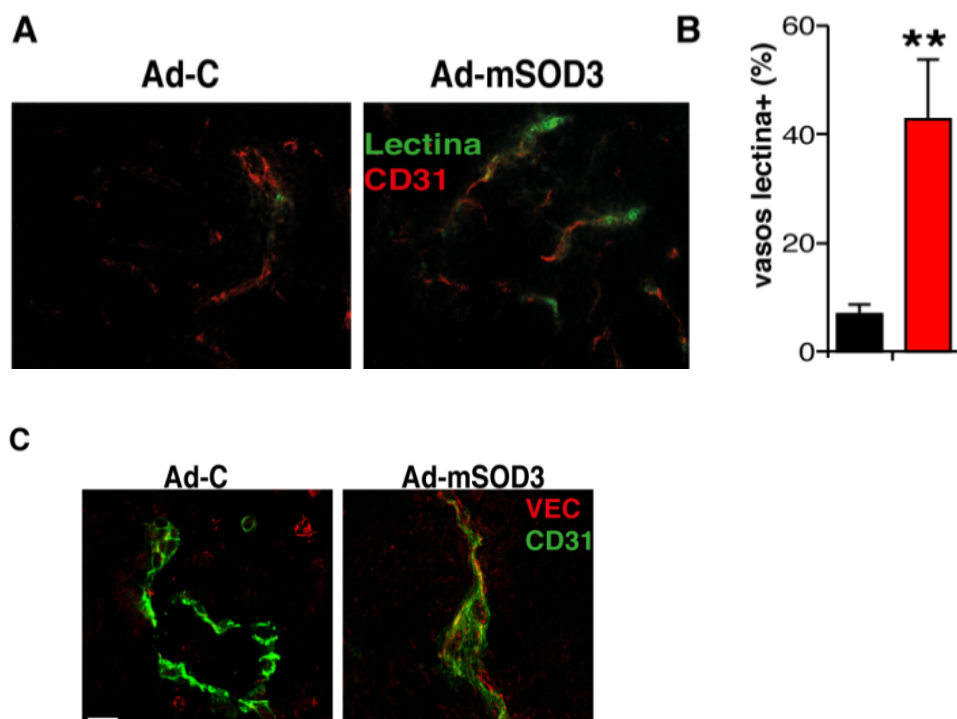


Figura 26. SOD3 aumenta la perfusión de los tumores. A) Tinción de CD31 (rojo) en secciones de tumores tratados con Ad-C y Ad-mSOD3 tras inyección con lectina-FITC (verde). B) Cuantificación de la perfusión de los vasos sanguíneos en las imágenes como A. C) Imágenes de inmunofluorescencia representativas de tumores teñidos para CD31 (verde) y VEC (rojo). * $p < 0.05$, prueba t de Student de dos colas.

4.3. SOD3 aumenta la transcripción de la VEC en células endoteliales

La VEC es responsable del ensamblaje de las uniones adherentes endoteliales y de la arquitectura de barrera endotelial (Giannotta et al., 2013). Nuestros resultados sugieren que la regulación de la estructura de los vasos sanguíneos por la SOD3 podría explicarse por la inducción de la VEC. Para determinar el mecanismo por el cual la SOD3 regula la expresión de la VEC, generamos un sistema *in vitro* usando la línea celular endotelial murina 1G11 (Dong et al., 1997) transducida con retrovirus para expresar la SOD3 (1G11-SOD3) o la GFP (1G11-mock) como control. Verificamos mediante inmunoblot que la expresión de la SOD3 estaba aumentada en las células 1G11-SOD3 en comparación con las células 1G11-mock (FIG. 27A). Apreciamos que esta diferencia de expresión era más notable en el medio condicionado por estas células ya que la SOD3 es una enzima principalmente extracelular (FIG. 27B). Además quisimos determinar si la SOD3 expresada de esta manera era enzimáticamente activa. Mediante la sonda dihidroetidio (DHE) observamos más actividad antioxidante en las células 1G11-SOD3 que en las 1G11-mock, tanto cuando se cultivaron en medio normal como cuando se cultivaron en medio condicionado por una línea tumoral, que promueve mayor estrés oxidativo (FIG. 27C). Estos resultados confirmaron que las células 1G11-SOD3 sobreexpresaban la SOD3 enzimáticamente activa.

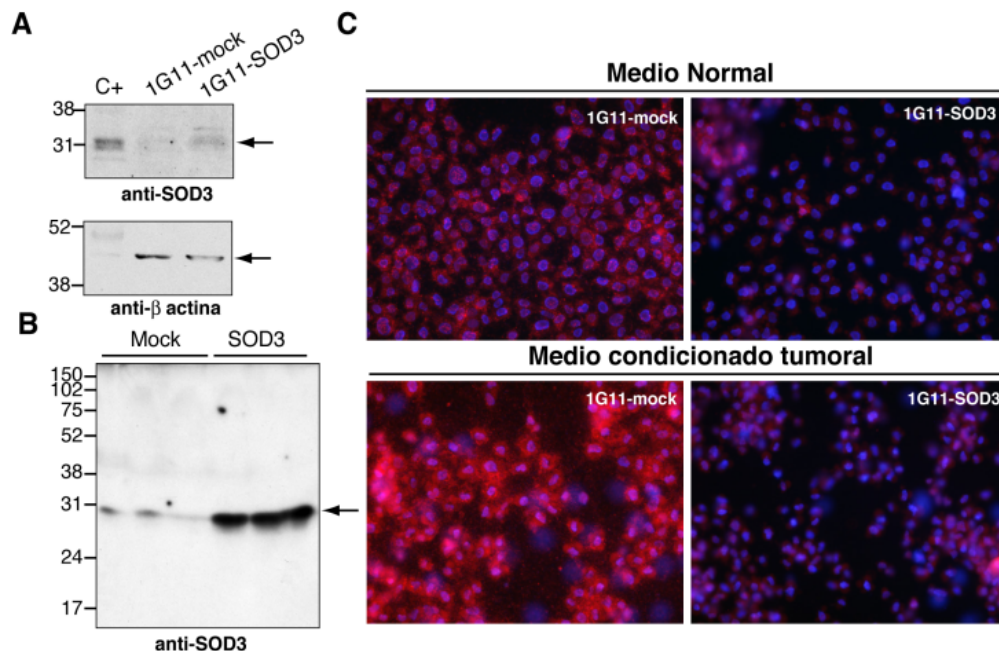


Figura 27. Caracterización de células 1G11 transducidas con la SOD3. A) Inmunoblot de la SOD3 en extractos celulares de células 1G11-mock y 1G11-SOD3. C+: extracto de pulmón. Se usó la hibridación de β-actina como control de carga. B) Inmunoblot de la SOD3 en los medios condicionados de las células 1G11-mock y 1G11-SOD3. C) Tinción de los cultivos celulares con la sonda permeable DHE, la cual emite fluorescencia roja cuando se oxida; los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul).

La sobreexpresión de la SOD3 en las células 1G11 indujo un aumento en la expresión de la VEC en comparación con las células 1G11-mock. Este incremento se observó tanto en la cantidad de proteína (**FIG. 28A y 28B**) como en la cantidad de ARNm (**FIG. 28C**). Por lo tanto, la SOD3 regula la expresión de la VEC en las células endoteliales.

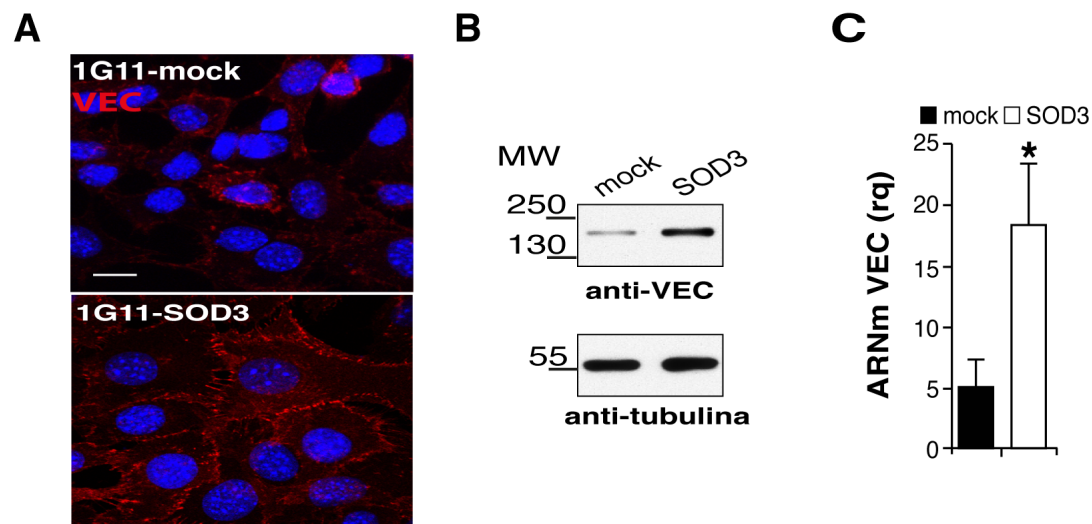


Figura 28. SOD3 induce la transcripción de la VEC en células endoteliales. A) Tinción de la VEC (rojo) en células 1G11-mock y 1G11-SOD3; contratinción nuclear con DAPI (azul) ($n > 20$ imágenes/condición). B) Análisis mediante inmunoblot de la VEC en las células 1G11-mock y 1G11-SOD3; tubulina, control de carga ($n = 3$). C) Niveles de ARNm de la VEC en las células ($n = 5$).

4.4. SOD3 aumenta los niveles de la VEC de forma dependiente del óxido nítrico

Tal y como se menciona anteriormente, una de las consecuencias indirectas de la actividad enzimática de la SOD3 es el aumento en la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), debido a que disminuye los niveles de $O_2^{\cdot -}$ (por su reducción a H_2O_2) y, en consecuencia, el óxido nítrico no se oxida (**FIG. 29A**). Mediante el uso de la sonda fluorescente de NO DAF-2, comprobamos que se produce un aumento en los niveles de NO intracelular en las células 1G11-SOD3 con respecto a las 1G11-mock (**FIG. 29B**).

También se analizó la influencia de la SOD3 en la distribución del NO *in vivo* en tumores LLC. Para ello, se llevó a cabo la inyección de lectina-FITC y la sonda de NO, DAR1, en ratones WT y SOD3^{-/-} tratados con Lov.

Detectamos la acumulación de la sonda DAR-1 especialmente cerca de algunas estructuras vasculares (determinadas por microangiografía con lectina-FITC) en los tumores de ratones WT donde se indujo la expresión de la SOD3, en comparación con los tumores de ratones SOD3^{-/-} (FIG. 29C). En esos tumores donde la SOD3 es inducido con Lov, un 76% del total de las estructuras lectina-FITC⁺ (n=46) mostraron mas intensidad de tinción DAR-1 que en el parénquima adyacente, mientras que en los tumores control se observó tinción intensa de DAR-1 en un 50% de los vasos (n = 34; p = 0.016, Pearson's χ^2). Estos resultados sugieren que la expresión de SOD3 regula la biodisponibilidad de NO tanto *in vitro* como *in vivo*.

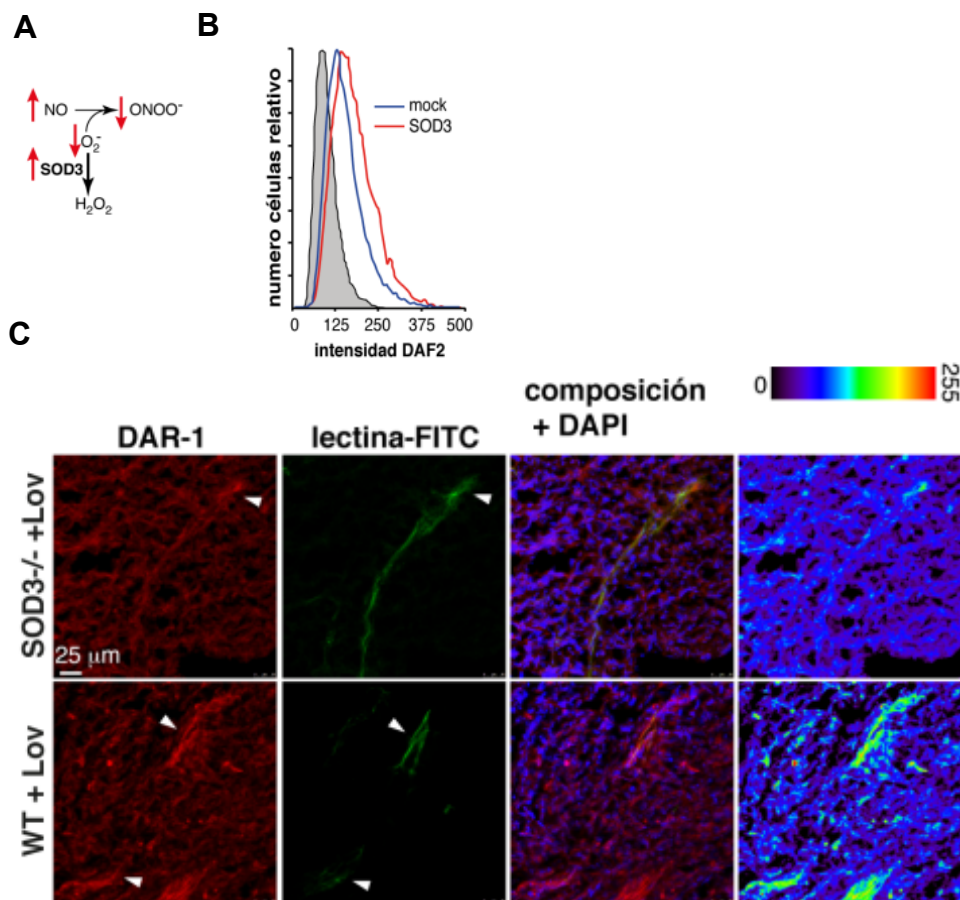


Figura 29. SOD3 aumenta la biodisponibilidad del NO. A) Relación entre el NO y la SOD3 por efecto de su actividad enzimática. B) Análisis por FACS de la tinción con DAF2 en células 1G11-mock y 1G11-SOD3. El área gris muestra tinción inespecífica. Los resultados son representativos de tres experimentos C) Distribución de NO en tumores LLC de ratones WT o SOD3^{-/-} tratados con Lov, donde se visualiza (de izquierda a derecha) la fluorescencia de DAR-1, microangiografía usando lectina-FITC y fusión de ambas fluorescencias más tinción de núcleos con DAPI (azul). En el panel derecho se muestra mediante pseudocolor la intensidad de fluorescencia de DAR-1. Las puntas de flecha indican vasos sanguíneos grandes. Las imágenes son una proyección en z de las secciones adquiridas usando microscopio confocal (n ≥ 20/condición).

Para analizar si el aumento en el NO, como consecuencia de la actividad de la SOD3, está implicado en la expresión de la VEC, llevamos a cabo ensayos de actividad del promotor de la VEC en células 1G11. Las células se transfectaron con una construcción del gen de la luciferasa bajo el control del promotor de la VEC (2,5 Kb). La cotransfección de la SOD3 aumentó la actividad luciferasa comparado con las células mock, mientras que el tratamiento con el inhibidor L-NMMA impidió este aumento en la actividad del promotor VEC (**FIG. 30A**).

Para implicar directamente al NO en la regulación de la transcripción de la VEC, las células 1G11-VEC-luc se incubaron con el donante de NO (DETA-NONOate). Los resultados de actividad promotora mostraron que a bajas dosis de DETA-NONOate (0,8 y 4 μ M) se inducía la actividad (**FIG. 30B**). Sin embargo, a elevadas concentraciones de DETA-NONOate (500 μ M) se observó el efecto contrario, inhibiendo la transcripción de VEC (**FIG. 30B**).

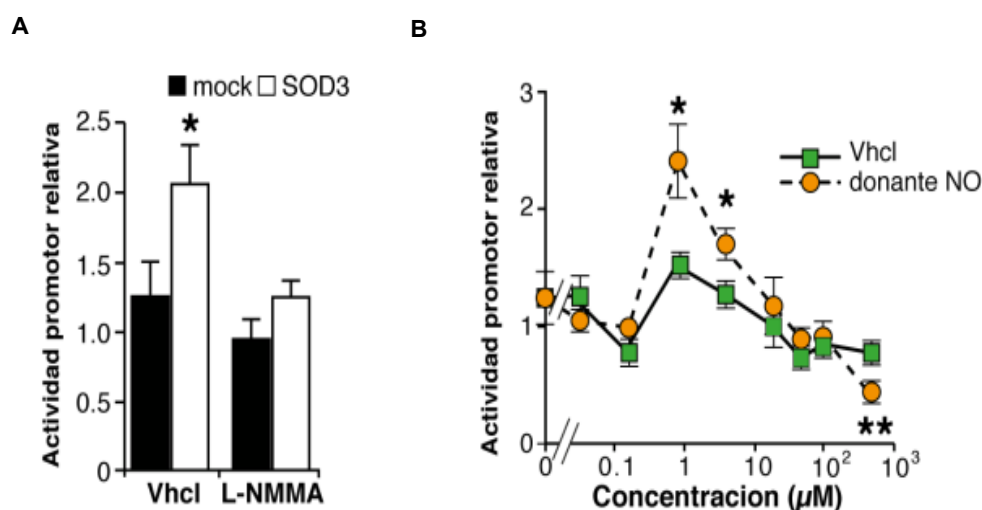


Figura 30. El efecto de la SOD3 sobre la transcripción de la VEC depende del NO. A) Actividad luciferasa relativa bajo el control transcripcional de VEC en células 1G11-mock o 1G11-SOD3 tratadas con vhl o L-NMMA ($n = 5$). B) Actividad relativa del promotor de VEC en células 1G11 tratadas con DETA-NONOate o Vhcl ($n = 3$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ prueba t de Student de dos colas.

Por lo tanto, estos resultados indican que la regulación de la transcripción de la VEC por la SOD3 puede deberse en parte al incremento en la biodisponibilidad del NO por la actividad de esta enzima.

4.5. SOD3 reduce la permeabilidad de las células endoteliales

Para analizar si el aumento de la VEC por la SOD3 tenía efecto sobre la permeabilidad de las células endoteliales, llevamos a cabo ensayos en *transwell* cuantificando la migración de dextrano-FITC (40kDa) añadido sobre una monocapa de células 1G11-SOD3 y -mock. Los resultados indicaron que la sobreexpresión de la SOD3 en células 1G11 reducía de forma significativa la permeabilidad en comparación con las células 1G11-mock (FIG. 31A). Con el fin de determinar si esta reducción en la permeabilidad dependía de la actividad enzimática de la SOD3, expresamos el mutante catalíticamente inactivo SOD3^{S195C} (Scavenius et al., 2013) en las células 1G11.

En este caso no se observaron cambios en la permeabilidad comparado con las células 1G11-mock (FIG. 31A), a pesar de que los niveles de expresión eran similares a los de la proteína activa (FIG. 31B).

Anteriormente hemos demostrado que una de las consecuencias indirectas de la actividad enzimática de la SOD3 es el aumento en la biodisponibilidad del NO. Para analizar directamente el papel del NO en la reducción de la permeabilidad mediada por la SOD3, analizamos la penetrabilidad del dextrano a través de monocapas de células 1G11-mock y 1G11-SOD3 tratadas con el inhibidor de las oxido nítrico sintetasas, L-NMMA. El tratamiento con L-NMMA aumentó la permeabilidad en las células 1G11-SOD3 hasta el mismo nivel de las células 1G11-mock (FIG. 31C).

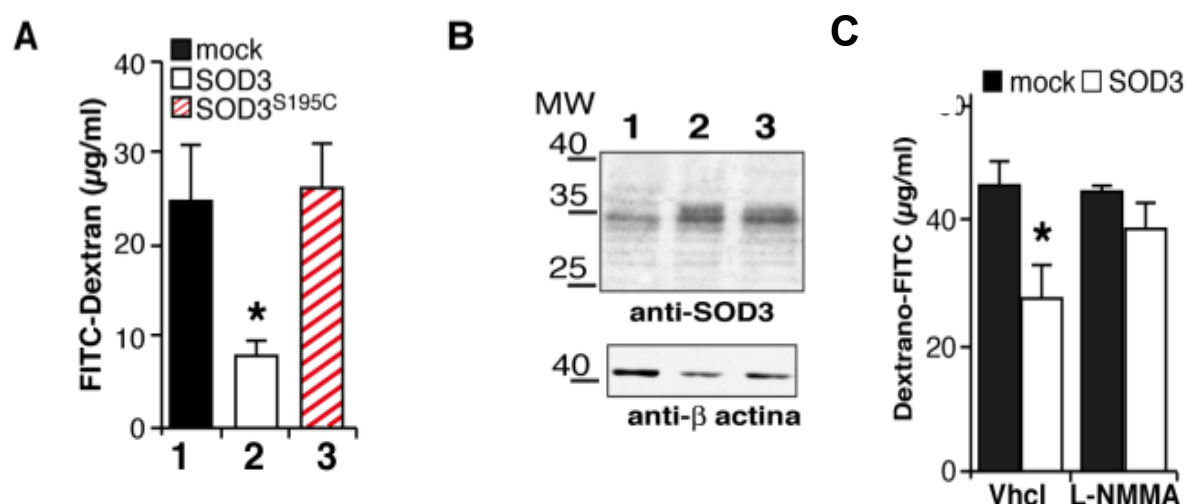


Figura 31. El efecto de la SOD3 sobre la permeabilidad endotelial depende del NO. A) Permeabilidad de dextrano-FITC en monocapas de células 1G11-mock (1), 1G11-SOD3 (2) y 1G11-SOD3^{S195C} (3) ($n = 3$). B) Inmunoblot de SOD3 en las células en A; se usó actina como control de carga. C) Permeabilidad de monocapas de células 1G11-mock y 1G11-SOD3 pretratadas con L-NMMA o Vhcl ($n = 3$). * $p < 0,05$ prueba t de Student de dos colas.

En conjunto, los resultados indican que la reducción en la permeabilidad vascular por la SOD3 está mediada por el aumento en la biodisponibilidad de NO, gracias a su actividad enzimática.

4.6. Asociación de la SOD3 y la VEC en tumores humanos

Los resultados obtenidos en los modelos de ratón, nos impulsaron a estudiar si existía una relación en la expresión de la SOD3 y la VEC en tumores humanos. Para ello, analizamos los niveles de ARNm de la SOD3 y la VEC en muestras de una cohorte de 102 pacientes con carcinoma colorectal (CCR) y 13 individuos sanos. Encontramos niveles de ARNm de la SOD3 más bajos en las muestras de CCR que en las muestras de colon normal (FIG. 32A). Así mismo, en esta cohorte observamos una disminución en los niveles de ARNm de la VEC en las muestras de CCR en comparación con las muestras no tumorales (FIG. 32B). De hecho observamos una correlación positiva ($r = 0,44$, $p < 0,0001$) entre los niveles de ARNm de ambos genes (FIG. 32C).

Se repitió este mismo análisis en una cohorte independiente compuesta por 87 muestras de CCR en estadio III y 19 muestras de colon sano. De nuevo encontramos que los niveles de ARNm de la SOD3 (FIG. 32D) y de la VEC (FIG. 32E) eran más bajos en CCR que en muestras de colon sano, existiendo una correlación positiva entre los niveles de ARNm para ambos genes ($r = 0,5$, $p < 0,0001$) (FIG. 32F). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la regulación de la VEC por la SOD3 identificada en tumores de ratón podría también ocurrir en cáncer de colon humano.

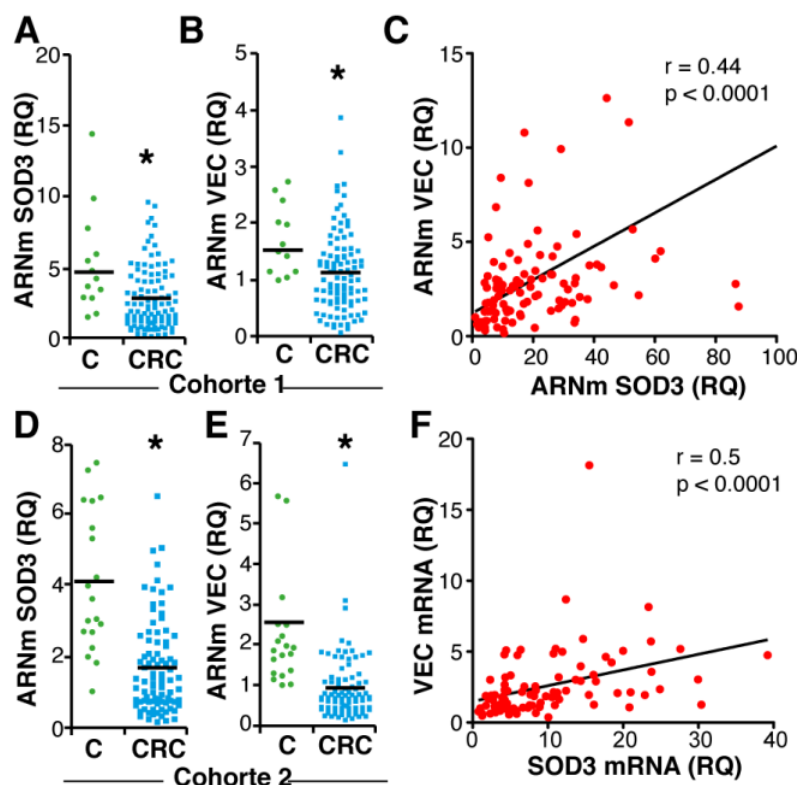


Figura 32. Coregulaci3n de la SOD3 y la VEC en tumores primarios de c3ncer colorectal. (A, B) Diagrama de dispersi3n que muestra los datos individuales y la media de los niveles de ARNm de la SOD3 (A) y la VEC (B) en muestras de controles sanos (C; n=13) y de c3ncer colorectal (CCR; n=102). (C) Correlaci3n entre los niveles de ARNm de la SOD3 y la VEC en la cohorte 1 de CCR. (D, E) Diagrama de dispersi3n que muestra los datos individuales y la media de los niveles de ARNm de la SOD3 (D) y la VEC (E) en otra cohorte de 19 controles sanos y 87 pacientes en estadi3 III de CCR. (F) Correlaci3n entre los niveles de ARNm de la SOD3 y la VEC en la cohorte 2 de CCR.

5. La inducción de la SOD3 aumenta la migración de linfocitos T e inhibe la actividad NF-κB

Teniendo en cuenta la importancia de las alteraciones que sufre el endotelio de los vasos sanguíneos tumorales sobre la reducción en la extravasación de células T al tumor (Hamzah et al., 2008), analizamos la función de la SOD3 específicamente en las EC sobre la adhesión y migración leucocitaria.

5.1. SOD3 regula diferencialmente la infiltración de linfocitos T y células mieloides *in vivo*

La inducción farmacológica de la SOD3 con Lov producía un aumento en el infiltrado de células T en los tumores (FIG. 19). Una cuestión relevante es si el aumento de la SOD3, en ausencia del co-tratamiento con Lov, era suficiente para producir este cambio en el infiltrado leucocitario. Analizamos la infiltración de linfocitos en secciones de tumores de los ratones tratados con Ad-SOD3 y Ad-C mediante inmunohistoquímica. Los resultados indicaron que la sobreexpresión de la SOD3 en el tumor aumentó significativamente la infiltración de células T (células CD3⁺) (FIG. 33A, B), tanto CD4⁺ como CD8⁺ (FIG. 33C, D). Por el contrario, las células mieloides (CD11b⁺) tendieron a disminuir en presencia de altos niveles de la SOD3 (FIG. 33A, B).

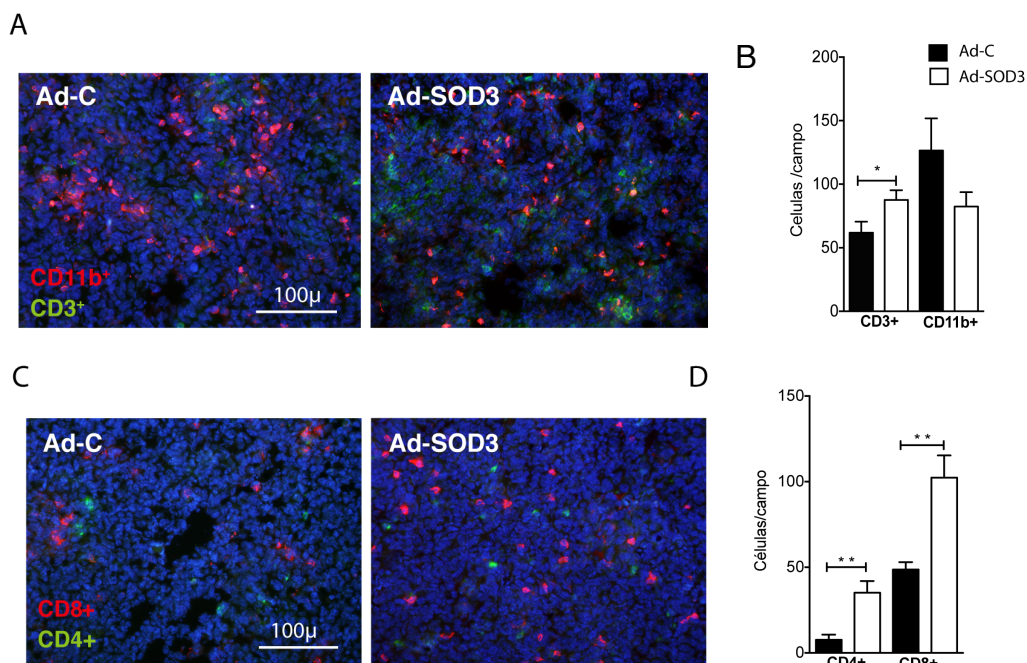


Figura 33. El aumento intratumoral de la SOD3 favorece la infiltración de linfocitos T. A) Imagen representativa de tumores LLC crecidos en ratones SOD3^{-/-} inyectados con Ad-C y Ad-SOD3, teñidos con CD11b (células mieloides, en rojo) y CD3 (células linfoides, en verde); barra de escala = 100 μm. B) Cuantificación de células mieloides y linfoides en A, (n = 10 imágenes por condición). C) Tinción de células CD4⁺ (verde) y CD8⁺ (rojo) en secciones de los tumores de A. D) Cuantificación de las células en C, (n = 10 imágenes por condición) *p<0,05; **, p<0,01 prueba t de Student de dos colas.

5.2. La sobreexpresión de la SOD3 en células endoteliales potencia la adhesión y trans migración de linfocitos T

Teniendo en cuenta los resultados *in vivo*, donde la inducción de la SOD3 aumentaba la infiltración de linfocitos T y no modificaba el infiltrado de células mieloides, pasamos a analizar *in vitro* la adhesión y trans migración de estos tipos celulares sobre monocapas de células endoteliales con diferentes niveles de la SOD3. Realizamos una cinética de adhesión de células T y células mieloides purificadas de bazo sobre las células endoteliales 1G11-SOD3 y 1G11-mock. Observamos que la sobreexpresión de la SOD3 aumentó significativamente la adhesión de linfocitos T, pero no de células mieloides, a las células endoteliales, en comparación con la adhesión sobre las células 1G11-mock (FIG. 34A, B). Los análisis de quimiotaxis, usando como quimioatrayente medio condicionado tumoral, también demostraron que la sobreexpresión de la SOD3 en las células endoteliales incrementaba significativamente la migración de los linfocitos T pero no de células mieloides (FIG. 34C). Los resultados mostraron que tanto la adhesión como la trans migración de linfocitos T aumenta cuando las células endoteliales sobreexpresan la SOD3.

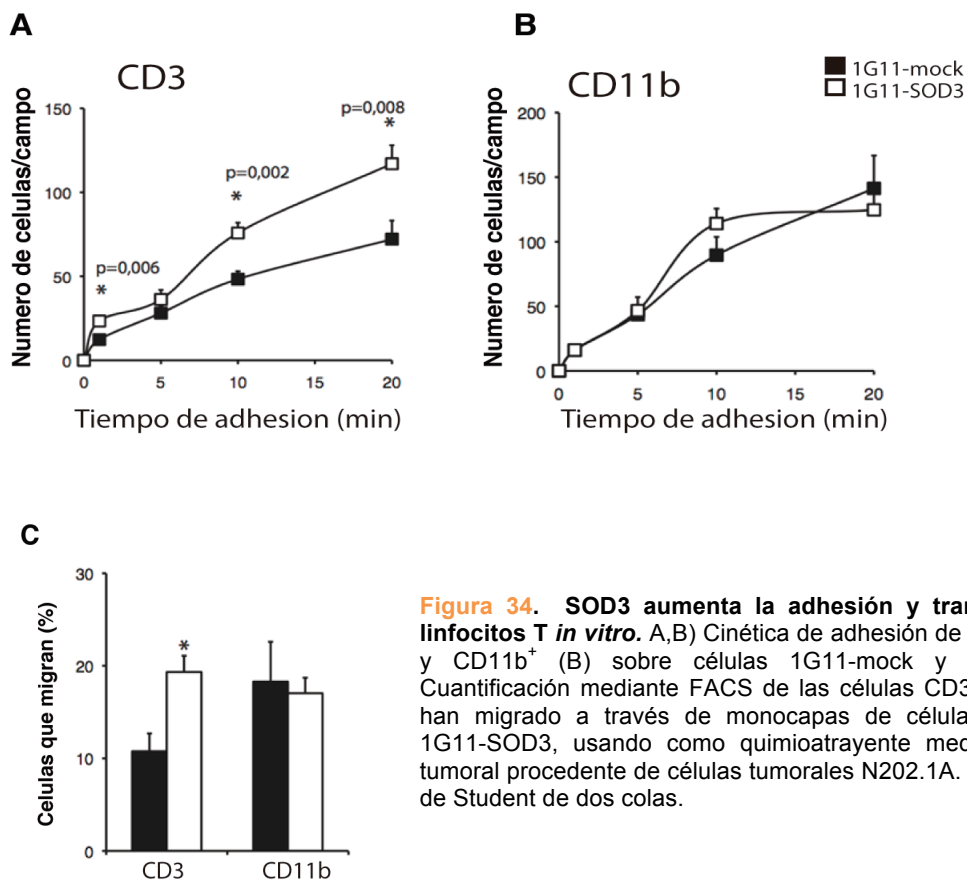


Figura 34. SOD3 aumenta la adhesión y trans migración de linfocitos T *in vitro*. A,B) Cinética de adhesión de células CD3⁺ (A) y CD11b⁺ (B) sobre células 1G11-mock y 1G11-SOD3 C) Cuantificación mediante FACS de las células CD3⁺ y CD11b⁺ que han migrado a través de monocapas de células 1G11-mock y 1G11-SOD3, usando como quimioatrayente medio condicionado tumoral procedente de células tumorales N202.1A. *p<0,05 prueba t de Student de dos colas.

5.3. SOD3 cambia el perfil de expresión génica en células endoteliales

Para investigar el mecanismo por el cual la SOD3 regula la adhesión y migración de linfocitos, llevamos a cabo un análisis de expresión mediante microarrays de células 1G11-mock y 1G11-SOD3 incubadas previamente con medio condicionado de células tumorales N202.1A durante 6 horas a 37°C; en estas mismas condiciones se llevaron a cabo ensayos de adhesión y migración *in vitro*.

Se identificaron 874 genes regulados positivamente y 294 regulados negativamente por la sobreexpresión de la SOD3. Entre esos genes, como era de esperar, apareció la SOD3 cuya expresión era de 13,51 veces más alta en las células 1G11-SOD3 que en 1G11-mock (**FIG. 35A**). Mediante el uso de la base de datos *Panther*, analizamos las vías de señalización que estaban reprimidas o inducidas por la sobreexpresión de la SOD3. Observamos que una de las vías que aparecía inducida por la SOD3 era señalización por integrinas, mientras que entre las reprimidas estaban la vía de inflamación mediada por quimioquinas y citoquinas (**FIG. 35B**).

En primer lugar analizamos las quimioquinas con un FDR menor al 0,05% (**FIG. 35C**). Seleccionamos aquellas con un valor de inducción o represión de ≥ 2 o ≤ -2 para validar por qPCR. Conseguimos validar 6 de las quimioquinas diferencialmente reguladas en el microarray, 3 reguladas positivamente: CXCL15 (con una expresión de +5,65 con respecto al control), CXCL14 (+14,62) y CXCL12 (+2,43), y 3 reguladas negativamente: CXCL10 (-12,55), CCL7 (-1,8) y CCL2 (-4,63) (**FIG. 35D**). Nuestros resultados indicaron que CCL2, una de las quimioquinas más frecuentemente asociada con mayor infiltración de células mieloides y una mayor agresividad del tumor (Nesbit et al, 2001; Ohta et al, 2003; Koide et al, 2004), estaba disminuida por la sobreexpresión de la SOD3 a nivel de ARNm y de proteína (**FIG. 35E**).

Uno de los factores de transcripción que controla la expresión de CCL2 es el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B). Llevamos a cabo el análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA) inducidos por NF- κ B usando los datos de expresión de las células 1G11-mock y -SOD3. Tanto el set de genes diana de la vía canónica ($p = 0,001$) como de la vía no canónica ($p = 0,011$) de NF- κ B aparecían negativamente regulados por SOD3 (**FIG. 35F**). Esto nos motivó a estudiar cómo SOD3 afecta a la activación de la vía de señalización canónica de NF- κ B, y su influencia sobre el tráfico de leucocitos al tumor.

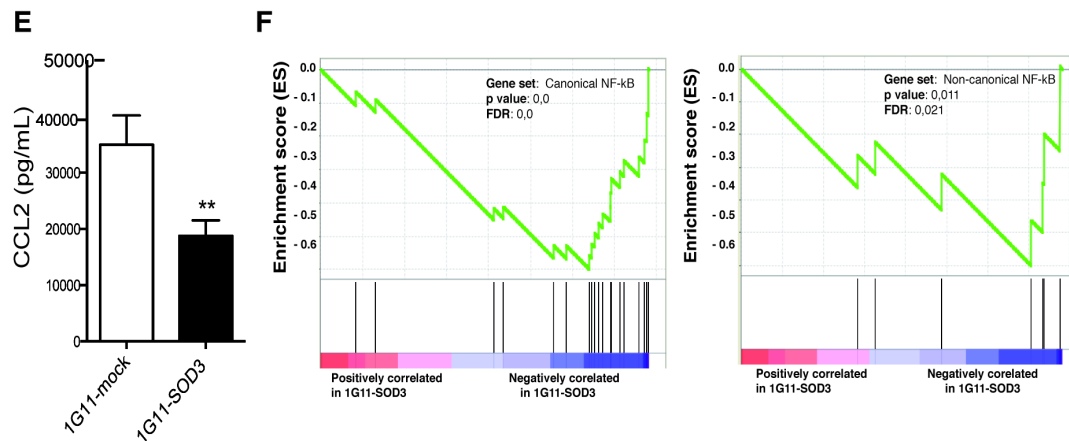
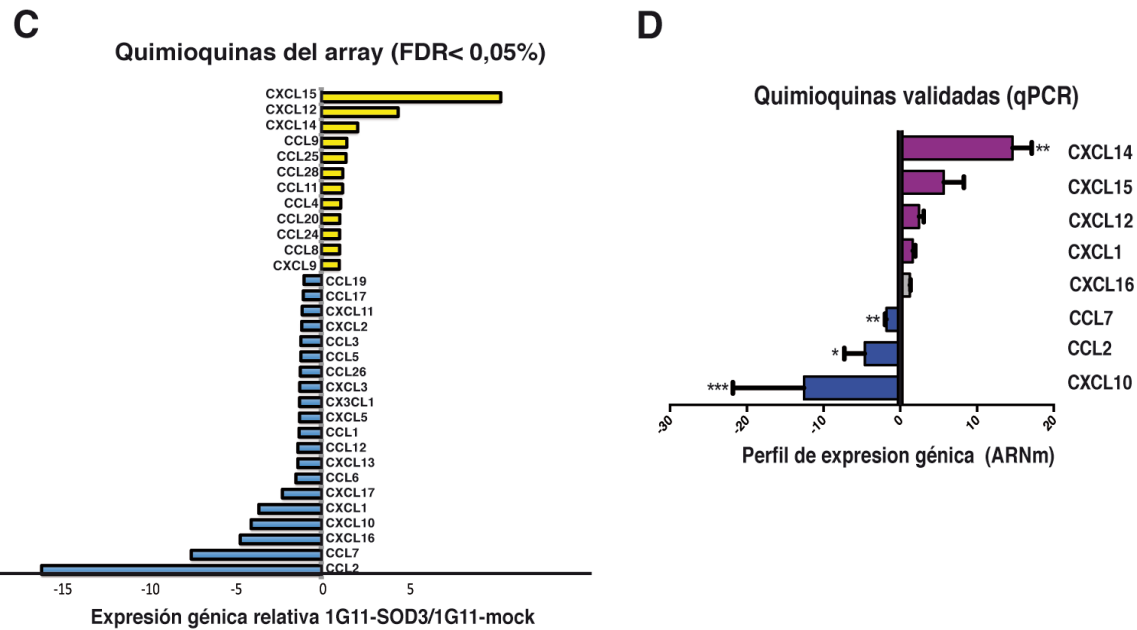
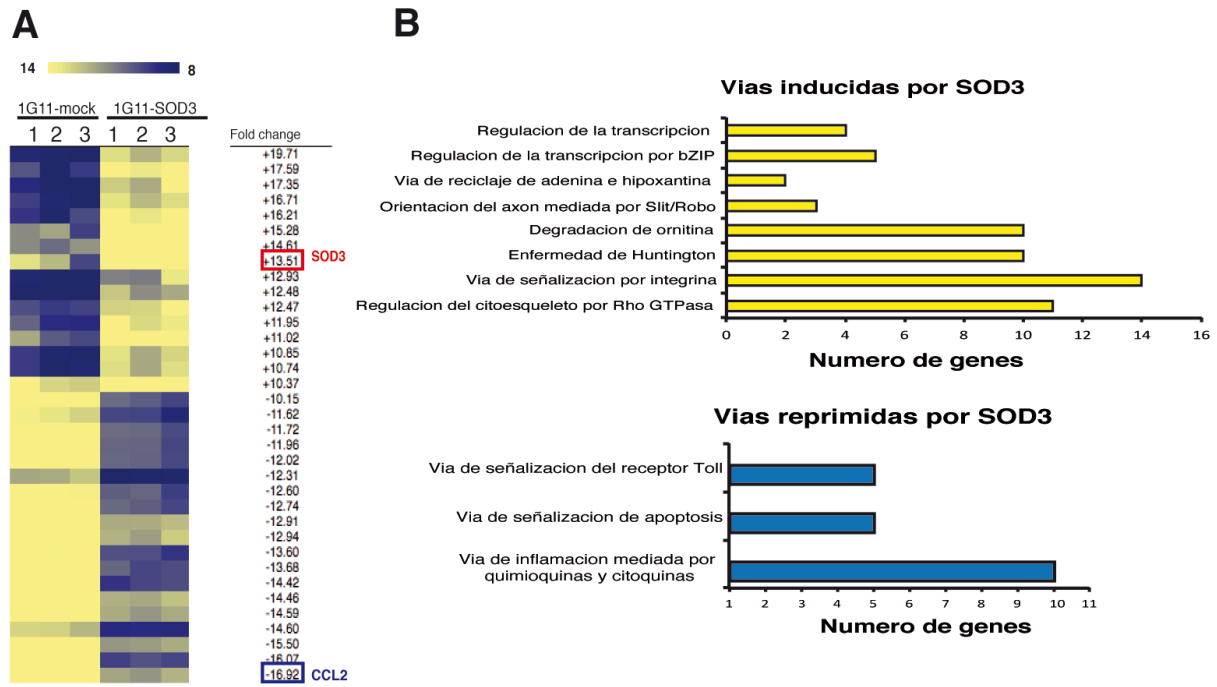


Figura 35. SOD3 induce un perfil genético anti-inflamatorio en células endoteliales. A) Representación *heat map* de los 35 genes con mayor expresión diferencial en el análisis de *microarray* del ARNm de las células 1G11-mock y 1G11-SOD3, indicando el valor de inducción o represión en las células 1G11-SOD3 respecto de las mock (*fold change*). B) Procesos biológicos de la base de datos *Panther* significativamente inducidos o reprimidos por la sobreexpresión de SOD3 (FDR <0,05). C) Representación del valor de expresión génica relativa de las quimioquinas procedentes de los datos del *microarray* en A, con un FDR < 0,05%. D) Validación mediante qPCR de 6 quimioquinas con un *fold change* ≥ 2 o ≤ -2 . E) Niveles de CCL2 en extractos de células 1G11-mock y 1G11-SOD3 mediante ELISA. F) Análisis de enriquecimiento del set de genes (GSEA) de las dos vías de activación de NF- κ B (canónica y no canónica), usando los datos de expresión génica del *microarray* en A. El set de genes de NF- κ B se muestra con líneas verticales negras, y la curva de enriquecimiento en verde. En rojo se indican los genes regulados positivamente y en azul los regulados negativamente por SOD3. Ambos set de genes se consideran significativos ($p < 0,05$; FDR < 0,05%). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ prueba t de Student de dos colas.

5.4. SOD3 previene la degradación de I κ B α

Para validar el resultado de que la SOD3 inhibe la activación de NF- κ B, transfectamos células 1G11-mock y 1G11-SOD3 con una construcción de luciferasa dirigida por un promotor que contiene sitios de unión de NF- κ B para analizar su activación; como estímulo inflamatorio incubamos las células durante 60 y 180 minutos en presencia de medio condicionado tumoral N202.1A. Los resultados indicaron que a estos tiempos se producía una disminución estadísticamente significativa en la actividad del promotor en las células 1G11-SOD3 en comparación con las 1G11-mock (**FIG. 36A**).

TNF α es uno de los estímulos fisiopatológicos principales de activación de la vía de señalización canónica de NF- κ B (Oeckinghaus et al., 2011). El tratamiento con TNF α induce el cambio de localización de NF- κ B desde el citoplasma al núcleo (Dharam et al., 2004). Analizamos mediante inmunofluorescencia la localización de NF- κ B (subunidad p65) tras el tratamiento con TNF α (10 ng/mL, 20 minutos, 37°C) en ambos tipos celulares (1G11-mock y 1G11-SOD3). En condiciones basales, p65 se localiza principalmente en el citoplasma de las células mock, pero tras la estimulación con TNF- α , p65 se localiza en el núcleo. En las células 1G11-SOD3 la traslocación nuclear de NF- κ B tras la estimulación se redujo significativamente comparado con las células 1G11-mock (**FIG. 36B, C**), lo que sugiere que la sobreexpresión de SOD3 impide la activación y translocación de NF- κ B.

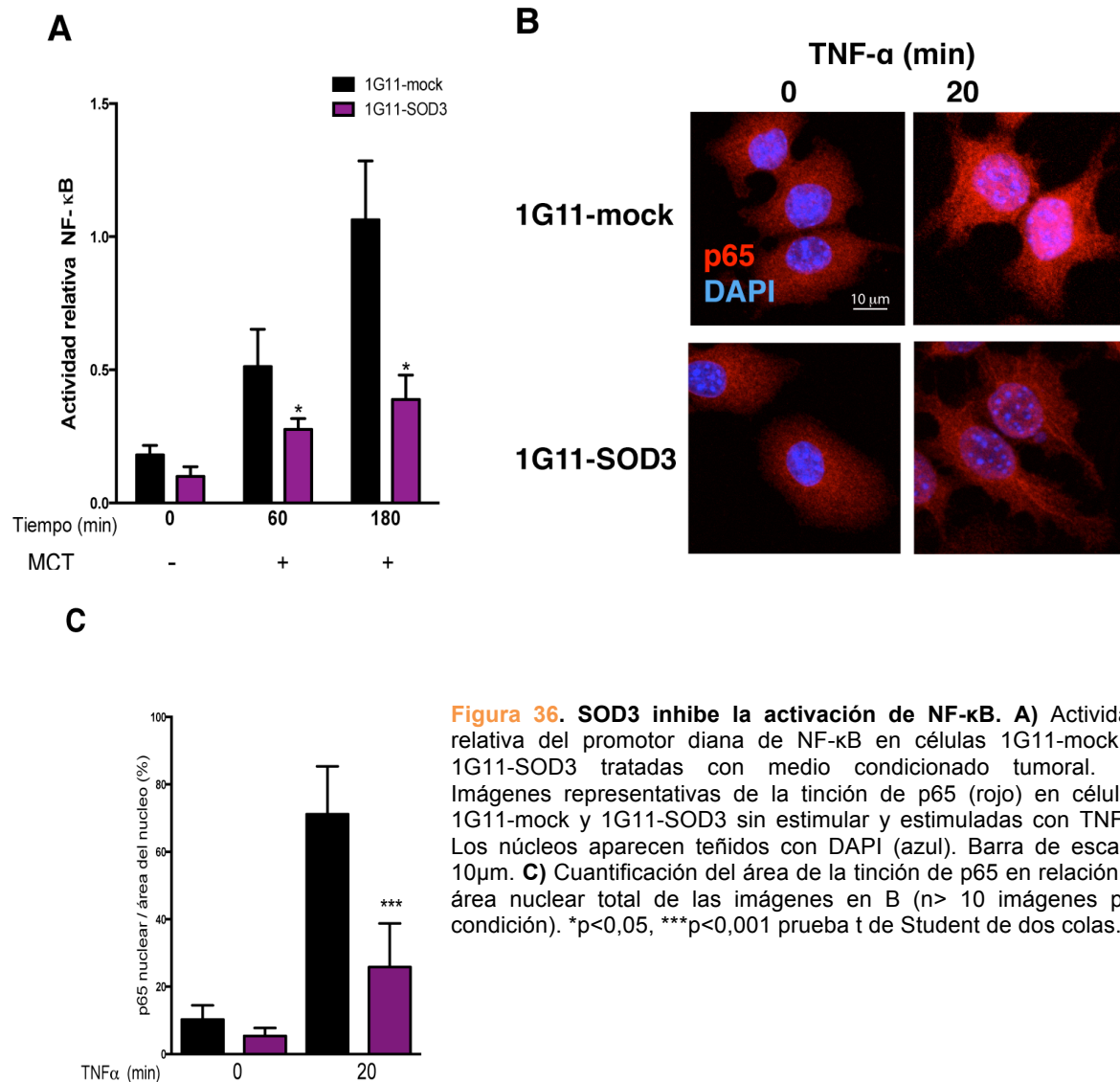


Figura 36. SOD3 inhibe la activación de NF-κB. **A)** Actividad relativa del promotor diana de NF-κB en células 1G11-mock y 1G11-SOD3 tratadas con medio condicionado tumoral. **B)** Imágenes representativas de la tinción de p65 (rojo) en células 1G11-mock y 1G11-SOD3 sin estimular y estimuladas con TNFα. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). Barra de escala: 10μm. **C)** Cuantificación del área de la tinción de p65 en relación al área nuclear total de las imágenes en B (n> 10 imágenes por condición). *p<0,05, ***p<0,001 prueba t de Student de dos colas.

En células quiescentes, la familia de proteínas inhibidoras de kappa B (IκB), principalmente IκBα e IκBβ, secuestran los dímeros de NF-κB en el citoplasma (Jen-Ruey et al., 2013). La activación de NF-κB por TNFα induce la degradación de las proteínas IκB. Estas proteínas se degradan a través de su fosforilación por el complejo IKB quinasa (IKK). Una vez fosforiladas, las proteínas IκB se ubiquitinan y se degradan a través del proteosoma, liberándose así los dímeros de NF-κB para su translocación al núcleo.

En primer lugar se analizó si SOD3 regula la expresión de IκBα en las células endoteliales. Para ello, analizamos el ARNm de las células 1G11-mock y 1G11-SOD3 sin estimular y tratadas con TNFα (10ng/mL, 20 minutos). El estímulo con TNFα indujo la expresión del ARNm de IκBα, siendo los niveles comparables entre ambos tipos celulares (**FIG. 37A**). A continuación analizamos la proteína IκBα tras una cinética de estimulación con TNFα. En células sin estimular y a tiempo corto de tratamiento (1 min) no observamos apenas

diferencias en los niveles de I κ B α (FIG. 37B, C). Sin embargo, a partir de los 5 minutos de estimulación, I κ B α disminuye en las células 1G11-mock, mientras que en las células 1G11-SOD3 se mantiene o incluso aumenta (FIG. 37B, C).

Se ha descrito que la degradación de I κ B α por el proteosoma está precedida por la adición de cadenas de ubiquitina en la lisina 48 (Oeckinghaus y Ghosh, 2009). Ante la posibilidad de que SOD3 regule el proceso de ubiquitinación de I κ B α previniendo así su degradación se estimularon las células con TNF α en presencia del inhibidor del proteosoma MG132; finalmente, se inmunoprecipitó I κ B α de los extractos celulares de estas células y se detectó por inmunoblot la señal de ubiquitina. En las células 1G11-SOD3 la ubiquitinación de I κ B α fue notablemente menor que en las células 1G11-mock para todos los tiempos de estimulación con TNF α , a pesar de que la cantidad de I κ B α inmunoprecipitada fue comparable (FIG. 37D).

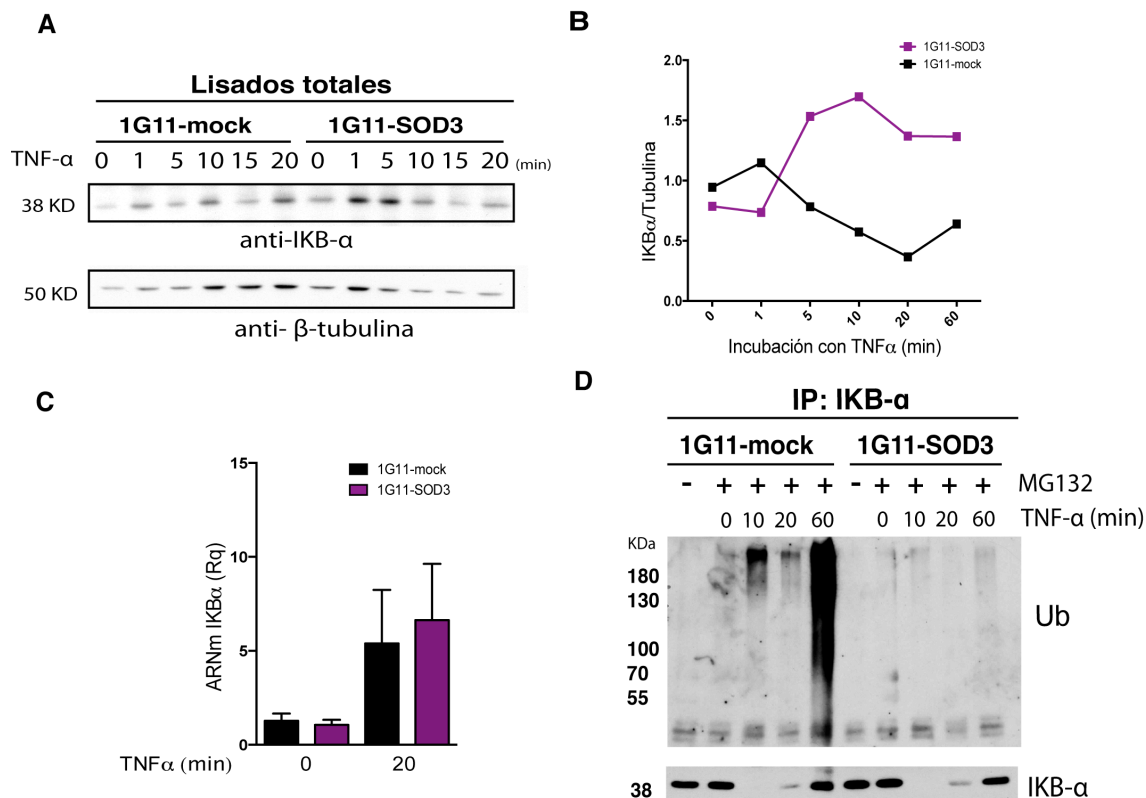


Figura 37. SOD3 inhibe la ubiquitinación y degradación de I κ B- α en células endoteliales. **A)** Inmunoblot con anti- I κ B- α (arriba) o anti- β -tubulina (abajo, control de carga) de extractos de las células 1G11-mock y 1G11-SOD3 tras una cinética de activación con TNF α (10ng/mL). **B)** Las bandas específicas de I κ B- α y tubulina en B se midieron por densitometría, y el ratio I κ B- α /tubulina fue calculada para cada tiempo. **C)** Niveles relativos de ARNm de I κ B- α en células 1G11-mock y 1G11-SOD3 sin estimular y estimuladas con TNF α (10ng/mL, 20 min) (n= 3 replicas de 2 experimentos independientes). **D)** Inmunoblot con anti-ubiquitina de inmunoprecipitados de I κ B- α de células 1G11-mock y 1G11-SOD3 estimuladas con TNF α (10ng/mL) en presencia del inhibidor del proteosoma MG132. Se muestra la señal de ubiquitina (arriba) y la señal de I κ B- α (abajo).

5.5. La inhibición de NF- κ B en células endoteliales potencia la adhesión y trans migración de linfocitos T

Nos preguntamos si la inhibición de NF- κ B regula la adhesión y migración de células T. Para ello usamos el inhibidor de NF- κ B BAY 11-7082, el cual disminuyó significativamente la actividad del promotor reportero de NF- κ B en células endoteliales tras la estimulación con TNF α (FIG. 38A). A continuación llevamos a cabo los ensayos de adhesión y trans migración de células CD3⁺ y CD11b⁺ (marcados diferencialmente) sobre células endoteliales 1G11 tratadas o no con BAY 11-7082. Observamos que el número de linfocitos T adheridos a células 1G11 fue significativamente mayor cuando las células endoteliales habían sido pre-tratadas con BAY 11-7082 (FIG. 38B). Para las células CD11b⁺ observamos que el inhibidor disminuye su adhesión a tiempos largos (FIG. 38B). De igual forma, observamos que la inhibición de NF- κ B en las células endoteliales incrementó significativamente la quimiotaxis de los linfocitos T, pero no de las células mieloides, frente a medio condicionado de células tumorales N202.1A (FIG. 38C). Estos resultados indican que el factor de transcripción NF- κ B regula diferencialmente la adhesión y quimiotaxis de linfocitos T y de células mieloides.

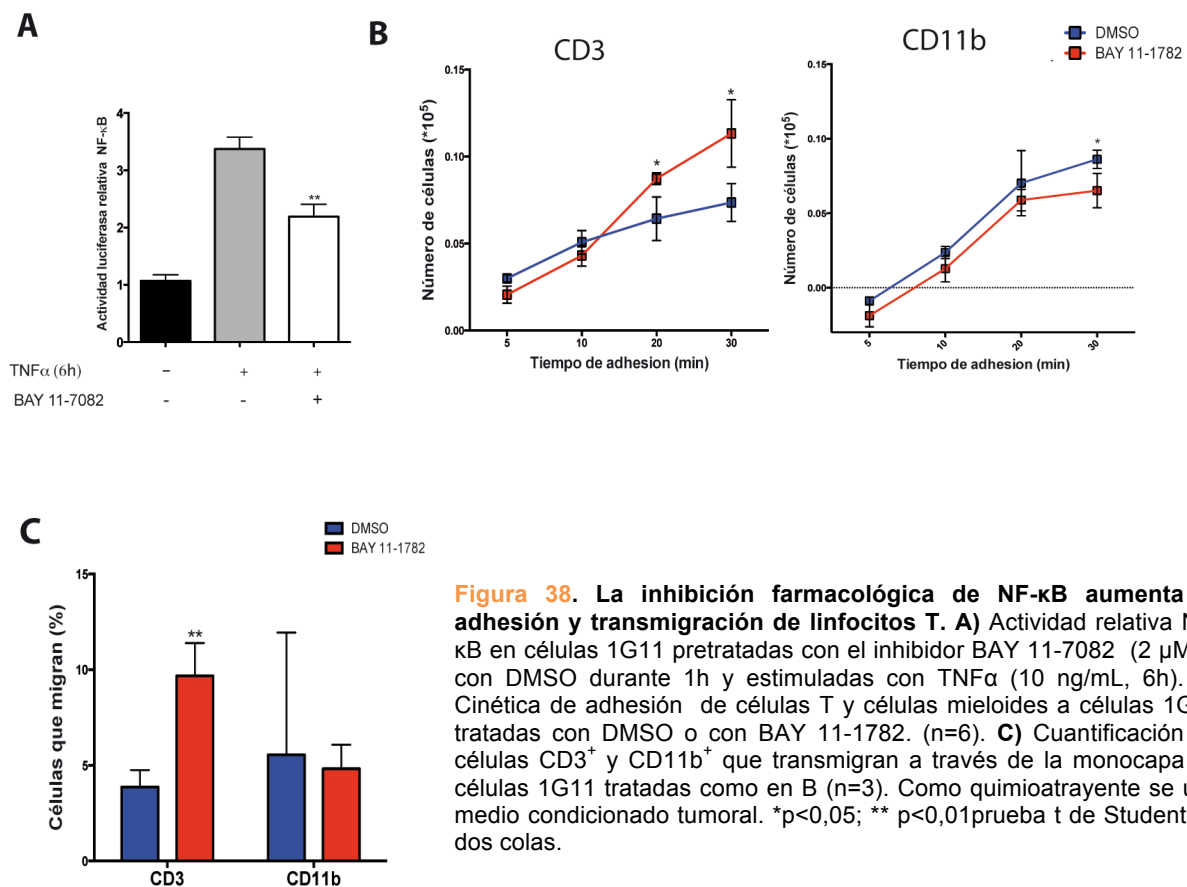


Figura 38. La inhibición farmacológica de NF- κ B aumenta la adhesión y trans migración de linfocitos T. **A)** Actividad relativa NF- κ B en células 1G11 pretratadas con el inhibidor BAY 11-7082 (2 μ M) o con DMSO durante 1h y estimuladas con TNF α (10 ng/mL, 6h). **B)** Cinética de adhesión de células T y células mieloides a células 1G11 tratadas con DMSO o con BAY 11-1782. (n=6). **C)** Cuantificación de células CD3⁺ y CD11b⁺ que transmigran a través de la monocapa de células 1G11 tratadas como en B (n=3). Como quimioatrayente se usó medio condicionado tumoral. *p<0,05; ** p<0,01 prueba t de Student de dos colas.

6. La inhibición de NF- κ B por la SOD3 requiere de su secreción en exosomas

Teniendo en cuenta que la SOD3 es una proteína mayoritariamente extracelular y que puede actuar de forma paracrina, nos preguntamos si la adición de la SOD3 al medio causaría los mismos efectos sobre las células endoteliales que la sobreexpresión mediante modificación genética. Añadir SOD3 exógena a las células endoteliales sería un sistema más fisiológico y cercano a como SOD3 actuaría en el endotelio.

6.1. Expresión y purificación de la HA-SOD3

Generamos una proteína recombinante mediante la inserción de una pequeña secuencia *de la proteína* HA (hemaglutinina) en el dominio N-terminal de la proteína SOD3 madura, justo detrás del péptido señal (HA-SOD3) (**FIG. 39A**). Se transfectaron células HEK-293T con la construcción HA-SOD3 (pCMV-Sport6-HA-SOD3), con el plásmido de la proteína SOD3 salvaje (pCMV-Sport6-SOD3) y con el plásmido vacío pCDNA3.1 como control, y recogimos el sobrenadante de estas células 4 días después de la transfección. Observamos mediante inmunoblot que la proteína HA-SOD3 se expresaba en estas células y se acumulaba en el medio extracelular, al igual que la proteína salvaje (**FIG. 39B**). También observamos mediante un ensayo colorimétrico que la inserción de la 'etiqueta' de HA no afectó a la actividad enzimática de la proteína recombinante HA-SOD3 secretada al medio (**FIG. 39C**).

Purificamos la proteína HA-SOD3 a partir de este medio enriquecido en la proteína enzimáticamente activa mediante cromatografía de afinidad con un anticuerpo anti-HA. En la Fig. 32D se muestra la tinción con azul de Coomassie de las fracciones recogidas durante la purificación de la proteína HA-SOD3, así como el análisis por inmunoblot de las mismas fracciones con el anticuerpo anti-HA. Aunque el análisis de las fracciones de la proteína eluída no se detectaron mediante Coomassie, cuando estas fracciones se concentraron pudimos observar que la pureza de la preparación era elevada. Se estimó la concentración de la proteína purificada (40ng/ μ L) mediante una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA) (**FIG. 39E**).

A continuación se llevó a cabo el ensayo de actividad enzimática SOD, con cantidades crecientes de la proteína (0,2 ng-5 μ g), y observamos que el proceso de purificación de HA-SOD3 no afectó a su actividad enzimática (**FIG. 39F**).

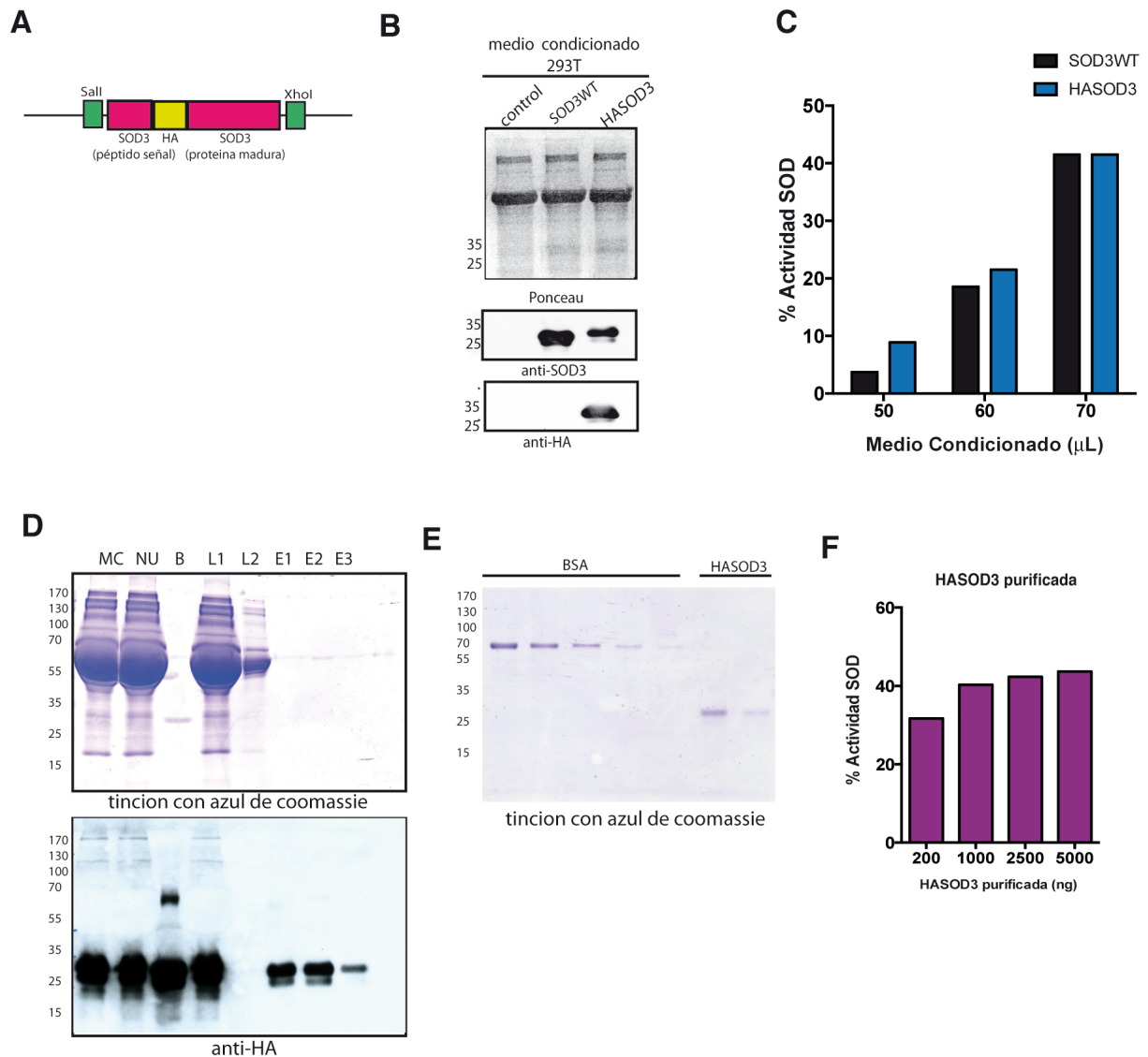


Figura 39. Expresión y purificación de la proteína HA-SOD3. A) Representación esquemática de la construcción de HA-SOD3. B) Inmunoblot del medio condicionado de células HEK-293T transfectadas con el plásmido vacío (control), SOD3 silvestre y HA-SOD3. Detección de la banda específica de SOD3 (arriba) y de HA (en medio). Abajo se muestra la tinción con rojo *Ponceau* de la membrana de nitrocelulosa. C) Ensayo colorimétrico de actividad enzimática SOD de cantidades crecientes del medio condicionado de las células HEK-293T transfectadas con SOD3WT y HA-SOD3. D) Fracciones de la purificación de la proteína HA-SOD3. Arriba se muestra la tinción con azul de *Coomassie* de las fracciones indicadas: MC (medio condicionado de partida); NU (fracción no unida); B (agarosa); L1 (1^{er} lavado); L2 (2^o lavado); E1 (1^{er} eluido); E2 (2^o eluido); E3 (3^{er} eluido). Abajo se muestra el inmunoblot de las mismas fracciones con un anticuerpo anti-HA. E) Cuantificación en gel de la fracción eluida de HA-SOD3. En los carriles del 1 al 5 se muestran cantidades decrecientes (en μ g) de BSA (0,5-0,03 μ g), en los carriles 6 y 7 cantidades decrecientes de la proteína HA-SOD3 purificada y concentrada (5 y 2,5 μ L). F) Ensayo colorimétrico de actividad enzimática SOD de HA-SOD3 purificada obtenida en E.

6.2. Las células endoteliales endocitan la SOD3 exógena

Para determinar si SOD3 es endocitada por células endoteliales, se incubaron células 1G11 con el medio enriquecido en HA-SOD3. Mediante microscopía confocal observamos que la HA-SOD3 añadida exógenamente se localiza dentro de la célula a tiempos cortos (5 min) y se acumula en el citosol e incluso en el núcleo a tiempos mas largos (1 y 5 h) (**FIG. 40A**).

Cuando se repitieron estos experimentos con la proteína HA-SOD3 purificada, observamos que aunque también se endocita en las células 1G11 de una manera dependiente de dosis, su patrón de distribución fue ligeramente distinto (**FIG. 40B**).

Mediante microscopía electrónica, analizamos en detalle la localización subcelular de la SOD3 exógena utilizando como fuente el medio condicionado enriquecido en HA-SOD3. Observamos que a los 5 min SOD3 se localiza principalmente en la membrana y en vesículas extracelulares (**FIG. 40C**); a tiempos más largos (5 h) aumenta la acumulación de la SOD3 en el citosol, en vesículas endocíticas e incluso en el núcleo (**FIG. 40C**).

6.3. La SOD3 presente en el medio condicionado, pero no la forma purificada, inhibe la actividad de NF- κ B en células endoteliales

Hemos descrito un efecto inhibitorio de la SOD3 sobre la actividad de NF- κ B en células endoteliales que sobreexpresan la proteína. Para estudiar si la adición de la SOD3 exógena inhibe también la actividad NF- κ B en las células endoteliales, se preincubaron células 1G11 con el medio condicionado enriquecido en HA-SOD3 ó con la proteína purificada y se estimularon con TNF α ; a continuación se midieron los niveles de ARNm de CCL2 como gen diana de NF- κ B. Sorprendentemente, solo cuando las células se incubaron con la SOD3 del medio, y no con la purificada, se redujo la transcripción de CCL2 (**FIG. 41A y B**).

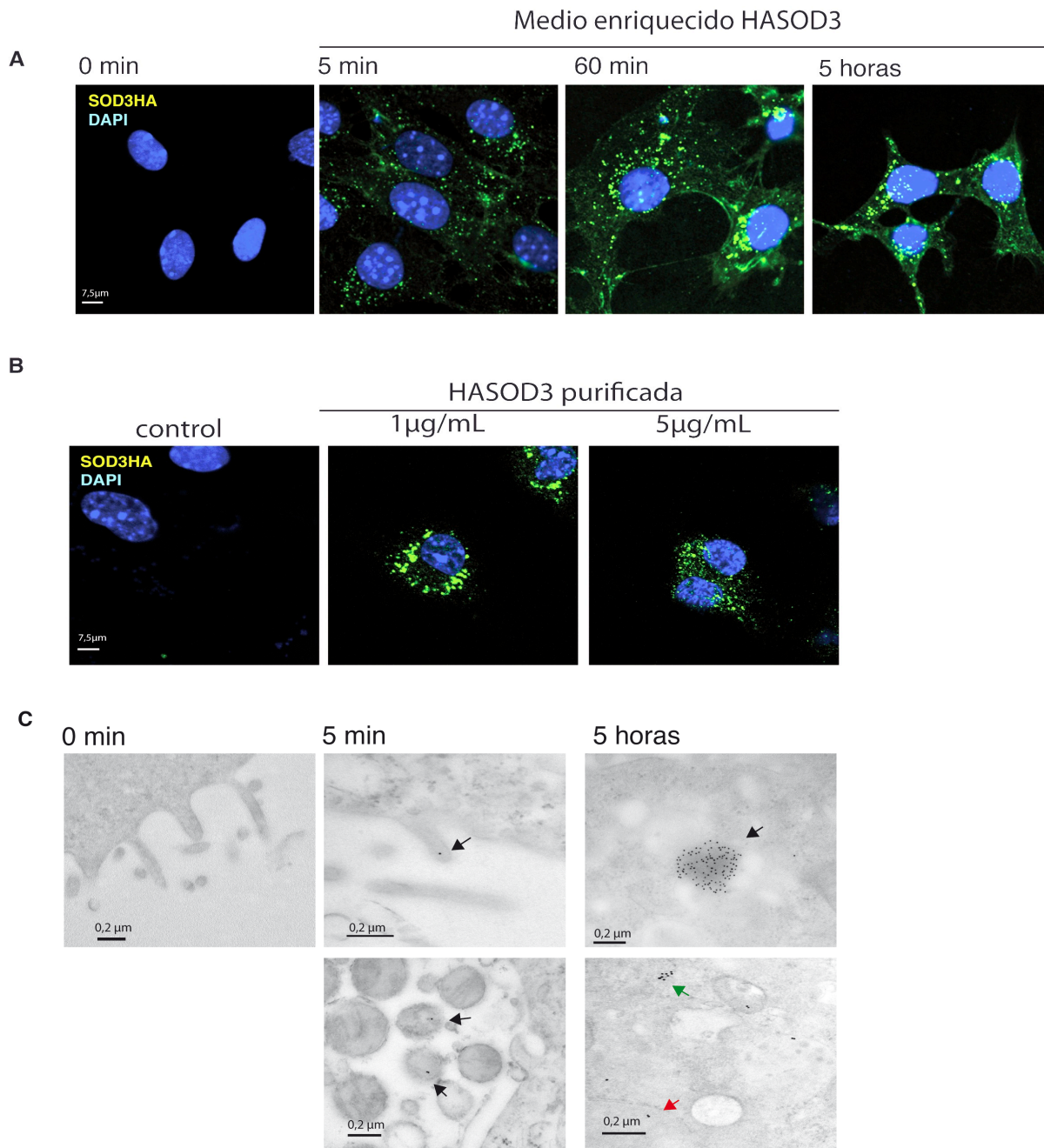


Figura 40. Endocitosis de la HA-SOD3 por células endoteliales. A, B) Microscopia confocal de células 1G11 incubadas con medio enriquecido en HA-SOD3 en los tiempos indicados (A) o incubadas con HA-SOD3 purificada en las cantidades indicadas durante 60 minutos (B) utilizando el anticuerpo anti-HA (verde). Los núcleos se muestran en azul (DAPI). Barra de escala: 7,5 μm C) Microscopía electrónica de transmisión de las células 1G11 incubadas con medio condicionado HA-SOD3 durante los tiempos indicados y teñidas con un anticuerpo anti-HA. Se indica la señal de HA-SOD3 en vesículas endocíticas (puntas de flecha de color negro), en el citosol (color verde) y en el núcleo (color rojo). Barra de escala: 0,2 μm.

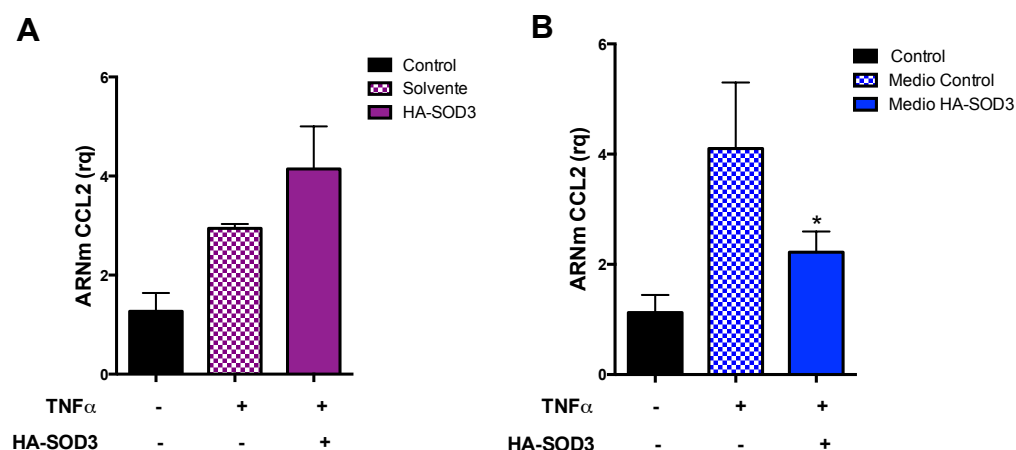


Figura 41. La adición de la SOD3 procedente de medio condicionado reprime la expresión de CCL2 inducida por TNF α en células endoteliales. A) Niveles relativos del ARNm de CCL2 en células 1G11 incubadas con HA-SOD3 purificada o con el solvente de la proteína y B) en presencia de medio condicionado HA-SOD3 o medio control. En ambos casos se estimularon las células con TNF α (10 ng/mL) durante 6 horas. * $p < 0,05$ prueba t de Student de dos colas.

6.4. SOD3 se secreta en exosomas

Teniendo en cuenta tanto los resultados de microscopía electrónica, en los que se observaba SOD3 en vesículas extracelulares, así como que solo la proteína procedente del medio extracelular inhiba la actividad de NF- κ B, se planteó la posibilidad de que una fracción de SOD3 se secretara al medio extracelular en exosomas. Partiendo del medio enriquecido en SOD3 y del medio control, se llevó a cabo la purificación de exosomas mediante la técnica de ultracentrifugación diferencial (FIG. 42A). Se determinó la eficiencia de la purificación mediante inmunoblot, donde se detectó la presencia de SOD3 en la fracción de exosomas (FIG. 42B). El análisis mediante microscopía electrónica de transmisión reveló una preparación homogénea de vesículas redondeadas de un tamaño en torno a 100 nm que es coincidente con el tamaño y aspecto de los exosomas. (FIG. 42C). Observamos que el 51% de los exosomas mostró tinción de HA-SOD3 mientras que no observamos señal en los exosomas procedentes del medio control (FIG. 42D).

Tanto los datos moleculares (inmunoblot) como citoquímicos (MET) demuestran que SOD3 se secreta al medio extracelular, al menos en parte, contenida en vesículas tipo exosomas.

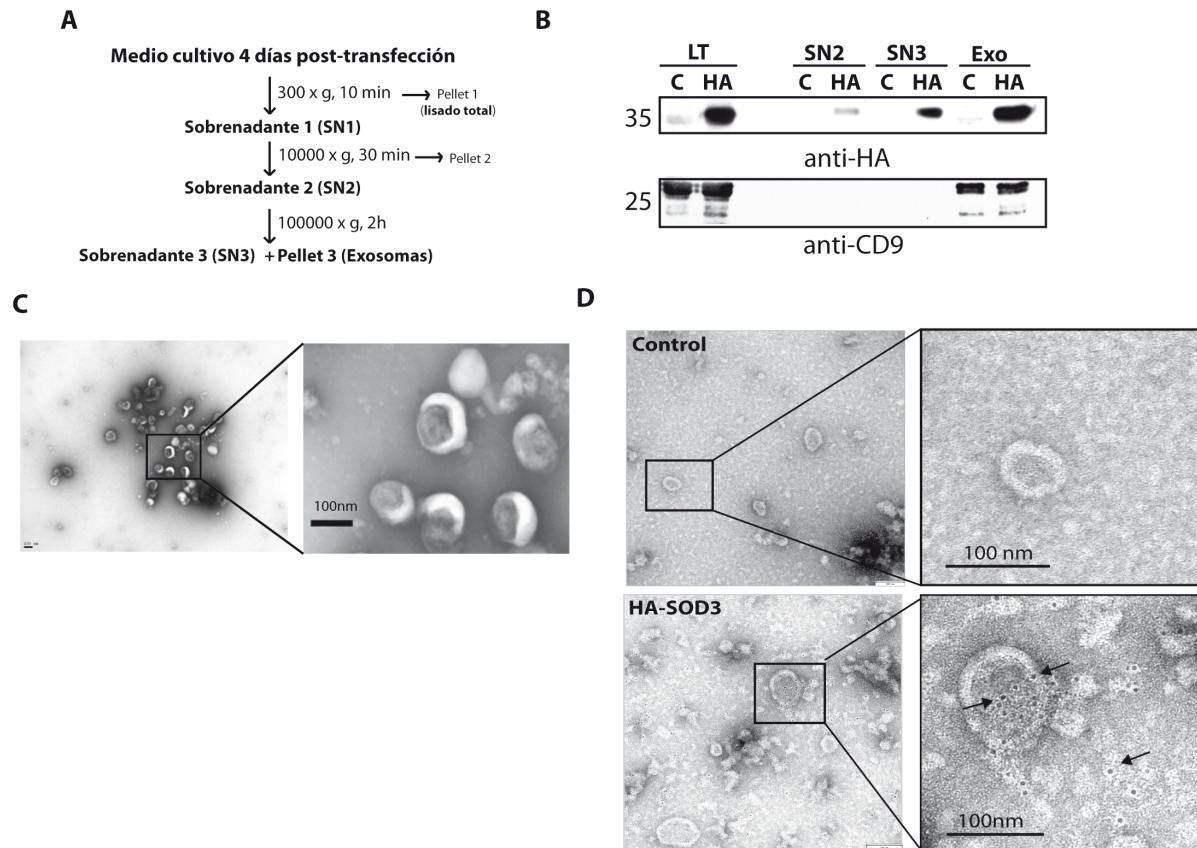


Figura 42. SOD3 se secreta en exosomas. A) Esquema de purificación de exosomas mediante la técnica de ultracentrifugación diferencial. B) Inmunoblot representativo de las fracciones de la purificación de exosomas de células HEK-293T control (C) y células HEK-293T transfectadas con HA-SOD3 (HA). Detección de la señal de HA (arriba) y del marcador de exosomas CD9 (abajo). C) Análisis por MET de la fracción de exosomas purificada del medio condicionado de unas células HEK-293T trasfectadas con HA-SOD3. D) Inmunomarcaje por MET de la fracción de exosomas en B con el anticuerpo anti-HA. Las flechas indican la detección de SOD3 en los exosomas.

6.5. La adición de la SOD3 en exosomas inhibe la activación de NF- κ B

Con el fin de demostrar si el efecto inhibitorio de la SOD3 sobre la activación de NF- κ B era dependiente de su internalización vía exosomas, se preincubaron células 1G11, transfectadas con la construcción reportera p(NF- κ B)3-luc, con HA-SOD3 purificada (100 ng) ó con exosomas purificados como se describió anteriormente; se verificó que la cantidad de SOD3 entre ambas preparaciones era equivalente por inmunoblot. Se observó en las muestras control un aumento equivalente en la activación de NF- κ B en respuesta a TNF α .

La pre-incubación con HA-SOD3 purificada tampoco disminuyó la actividad del promotor dependiente de NF- κ B (FIG. 43A), tal y como habíamos observado al analizar los niveles del ARNm de CCL2 (FIG. 41A). Sin embargo la adición de la fracción de exosomas procedentes del medio enriquecido en HA-SOD3 redujo significativamente la actividad del reportero de NF- κ B (FIG. 43B). Por tanto podemos concluir que la inhibición en la actividad NF- κ B a través de la SOD3 en las células endoteliales precisa de la localización de la enzima en exosomas.

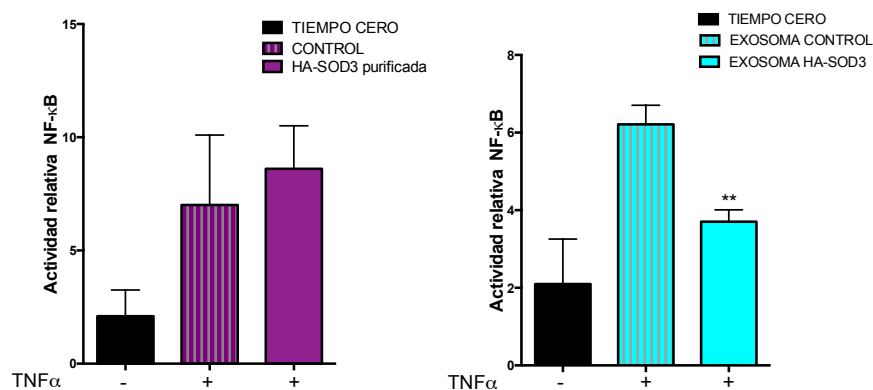


Figura 43. La localización de la SOD3 en exosomas es necesaria para la inhibición de NF-κB. Actividad relativa NF-κB en células 1G11 preincubadas con HA-SOD3 purificada o con el solvente de la proteína (control) y con exosomas HA-SOD3 o exosomas control. El tratamiento con TNFα (10 ng/mL) se realizó durante 6 horas. **p<0,05 prueba t de Student de dos colas.

6.6. Estudio del interactoma de SOD3

Para determinar el mecanismo por el cual SOD3 regula la actividad NF-κB, se analizó el conjunto de proteínas que interaccionan en las células endoteliales con la HA-SOD3 procedente de medio condicionado. Para ello se optó por combinar una estrategia de inmunoprecipitación con una de proteómica cuantitativa basada en espectrometría de masas. Concretamente, se optó por un método *label-free* por su simplicidad experimental y por la capacidad de analizar cantidades muy pequeñas de proteína. Se incubaron las células 1G11 con el medio enriquecido en HA-SOD3 o el medio control durante 5 horas, tiempo en el que previamente habíamos observado la acumulación intracelular de la SOD3 (FIG. 40C). A continuación se lisaron las células y se inmunoprecipitó HA-SOD3 de los extractos totales de las muestras control y HA-SOD3 (FIG. 44A).

Se identificaron un total de 588 proteínas inferidas a partir de la identificación de 4800 péptidos con un FDR< 1%. Las 588 proteínas se clasificaron en base a su valor q en 41 proteínas de interacción de alta probabilidad con HA-SOD3 (q valor <0,01); 24 proteínas de interacción de ligera probabilidad (q valor < 0,05); 89 proteínas de interacción de baja probabilidad (q valor > 0,05) y 362 proteínas que no interaccionan con HA-SOD3. Se identificaron 66 proteínas de baja interacción con el control (q valor> 0,05); 5 proteínas de interacción ligera (q valor < 0,05) y una proteína de interacción de alta probabilidad (q valor <0,01) (FIG. 44B, C). Mediante la base de datos *Gene Ontology* se analizó la localización celular de las 41 proteínas candidatas a interaccionar con HA-SOD3. El 32% de las proteínas forman parte del componente de la matriz extracelular (ECM) como sindecano-1 y -2, glipicano-6, y fibulinas -1, -2 y -5; el 14% de las proteínas tienen localización nuclear como el factor de transcripción E3, el factor 2 de expresión de mielina (del inglés *myelin expression factor 2*); otro 14% de las proteínas se localizan en el citosol como la proteína 1

disociada de NEDD8 y asociada a culina ó CAND1 (del inglés *cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1*). Un dato interesante fue que un 18% de las proteínas se han descrito localizadas en exosomas como la filamina B, sindecano-4, la proteína 1 de matriz extracelular tipo fibulina contenedora de EGF ó EFEMP1 (del inglés *EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1*); también aparecía un 9% de proteínas de localización en retículo endoplásmico como la proteína ubiquitina ligasa E3 RNF103 (FIG. 44D).

Se calculó la abundancia relativa (expresada como logaritmo en base 2) entre las muestras HA-SOD3 y control. En la TABLA 10 se muestran las 21 proteínas con un ratio de intensidad superior a 2,5 veces en las muestras HA-SOD3. Una de las proteínas que se detectó en este análisis es fibulina-5, cuya interacción con SOD3 ya se ha descrito (Andrew et al., 2004) y que consideramos un control positivo de los resultados de este abordaje experimental.

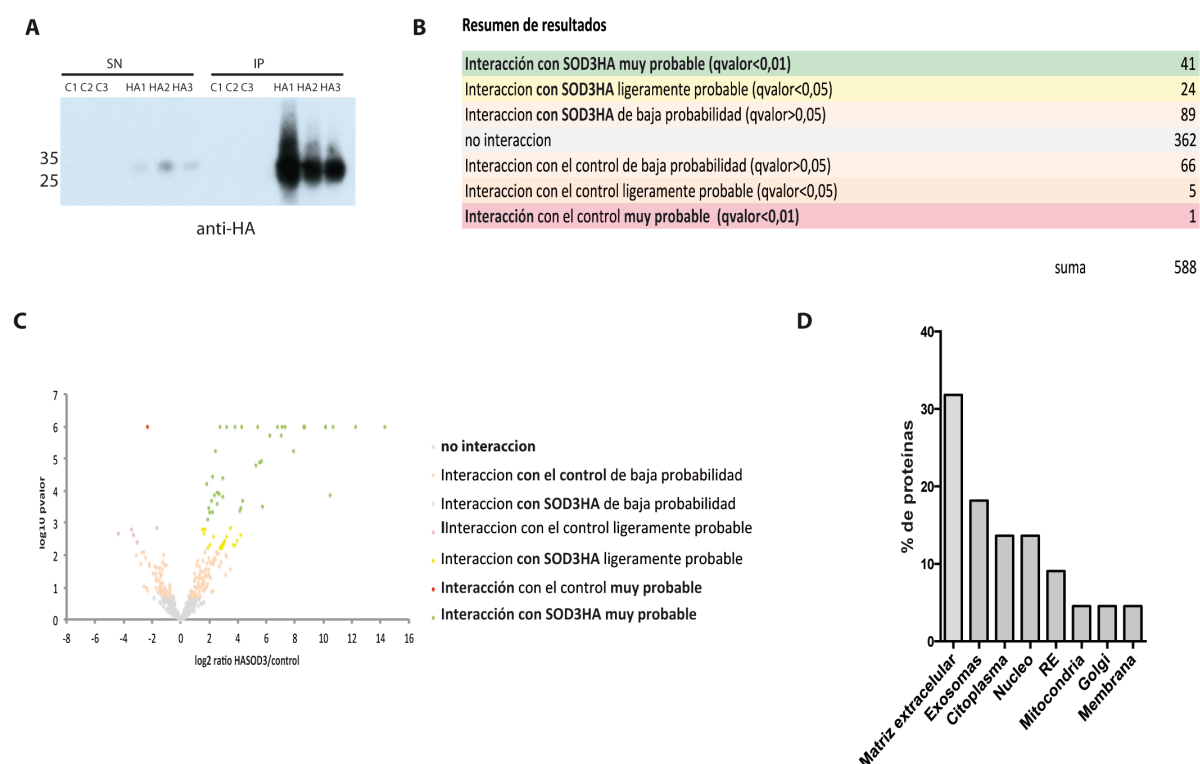


Figura 44. Análisis de las proteínas que interaccionan con la SOD3. A) Inmunoblot con anticuerpo anti-HA de los inmunoprecipitados obtenidos a partir de células 1G11 incubadas con medio enriquecido en HA-SOD3 (HA1, HA2, HA3) o con el medio control (C1, C2, C3) durante 5 horas. SN: sobrenadante de la inmunoprecipitación; IP: inmunoprecipitado. Se muestran las 3 réplicas biológicas que se usaron en los análisis de proteómica. B) Resumen de la probabilidad de interacción de las proteínas con SOD3 (C), Representación de la magnitud del enriquecimiento de cada proteína en las muestras HA-SOD3 con respecto al control (ratio de intensidad). D) Localización subcelular de las 41 proteínas de alta probabilidad de interacción con SOD3.

TABLA 10. Proteínas de alta probabilidad de interacción con la SOD3

Nombre de la proteína	Localización celular	Log ratio HA-SOD3/control
Proteína ubiquitina ligasa E3 RNF103	RE	+10,64
Subunidad 1 glicosiltransferasa de la proteína Dolicol-difosfooligonucleótidosacarido	RE	+10,49
Factor de transcripción E3	NÚCLEO	+10,15
Factor de expresión de mielina 2	NÚCLEO	+8,66
Superóxido dismutasa extracelular (SOD3)	ECM/ NÚCLEO	+8,62
Sindecano-4	ECM/EXOSOMA	+7,29
Proteína CARD de interacción con Bcl10	MEMBRANA	+7,02
Filamina B	ECM/EXOSOMA	+6,76
Sindecano-1	ECM	+6,24
Proteína de unión al ADN de doble cadena	MITOCONDRIA	+5,69
Proteína disociada de NEDD8 y asociada a culina 1(CAND1)	NÚCLEO / CITOPLASMA	+5,62
6-fosfogluconato deshidrogenasa	CITOPLASMA	+5,55
Glipicano-6	ECM	+5,36
Sindecano-2	ECM	+4,32
Subunidad beta de la enzima trifuncional	GOLGI/NUCLEO	+4,28
Galectina-9	NÚCLEO / CITOPLASMA	+4,12
Proteína 1 de matriz extracelular tipo fibulina contenedora de EGF (EFEMP1)	EXOSOMA	+3,21
Proteína Krt78	ECM	+2,95
Fibulina-1	ECM	+2,94
Fibulina-2	ECM	+2,75
Fibulina-5	EXOSOMA	+2,67
Glutation peroxidasa	CITOPLASMA	+2,54

DISCUSIÓN

1. La lovastatina modifica la función vascular y el infiltrado en tumores

La progresión tumoral induce la formación de nuevos vasos sanguíneos, los cuales son aberrantes e hiperpermeables. Estos reducen la perfusión tumoral así como la eficacia de la quimioterapia y la diapédesis leucocitaria (Carmeliet y Jain, 2011). Las terapias antiangiogénicas están dirigidas a la inhibición del crecimiento de los vasos sanguíneos con la finalidad de frenar la progresión tumoral, pero los tumores adquieren resistencia y continúan progresando (Bueno et al., 2017). Sin embargo, se ha demostrado que estas terapias inducen una fase de normalización transitoria y reversible en la vasculatura en la cual la eficacia de la quimioterapia durante ese periodo es mayor (Winkler et al., 2004). Por lo que una normalización sostenida de los vasos sanguíneos podría mejorar el suministro de fármacos durante mayor tiempo y propiciar una mejor respuesta antitumoral (Jain, 2005). En este trabajo proponemos que la vascularización anormal de los tumores se debe a la exposición de estos vasos a la inflamación crónica característica del MT. Nuestro principal objetivo ha sido estudiar las características de la vasculatura tumoral en ratones tras el tratamiento con la lovastatina como agente anti-inflamatorio, y su repercusión sobre la eficacia de la quimioterapia así como sobre la respuesta inflamatoria anti-tumoral.

Observamos aquí que el tratamiento con Lov de ratones Tg-neu indujo la normalización de los vasos sanguíneos tumorales. Esta normalización consistió en una serie de cambios en estructura y función de los mismos que se reflejó en una mejora de la quimioterapia y en una modulación de la respuesta inflamatoria. La mejora de la quimioterapia fue debida a un aumento en el contenido de Doxo en el tumor (**FIG. 7**). Aunque en este trabajo no se ha estudiado, la lovastatina también puede aumentar la actividad citotóxica de la doxo (Rozados et al., 2008). Por lo que el aumento en la eficiencia de la quimioterapia que observamos puede ser debido a la combinación de ambos efectos, aumento en el contenido y actividad de la doxo.

Otra de nuestras observaciones es que el tratamiento con Lov induce un programa de inmunidad antitumoral. Por una parte aumenta selectivamente la infiltración de células T CD3⁺, mientras que reduce, aunque no significativamente, la infiltración de TAM al tumor (**FIG. 13**). El reclutamiento y diferenciación de los TAM ofrece una oportunidad para la prevención y el tratamiento del cáncer, debido a su importante papel en la inflamación y la angiogénesis tumoral (Qian y Pollard, 2010). El tratamiento con Lov no solo afectó al número de TAM infiltrantes, sino también a la polarización de los mismos, inhibiendo el fenotipo M2 (**FIG. 17**). Estos resultados fueron contrarios a los que se observaron en un modelo de glomerulonefritis, donde el tratamiento con estatinas activó los macrófagos M2 mediante la inducción de IL-10 (Fujita et al., 2010). Esta discrepancia puede deberse a que

en nuestro modelo el tratamiento con Lov redujo significativamente la expresión de IL-10. En cualquier caso, parece que el tratamiento con Lov no causa una reprogramación completa de los TAM, sino que induce una firma genética específica que reduce la diferenciación de los mismos hacia un fenotipo M2-*like* pro-tumorigénico.

Con el fin de identificar las moléculas que median los cambios inducidos por Lov en el estroma tumoral de estos ratones Tg-neu, analizamos los perfiles de expresión de los tumores desarrollados en los ratones tratados con Lov o Vhcl. Estos análisis nos permitieron detectar una serie de genes diferencialmente regulados por el tratamiento con Lov (**Tablas 8 y 9**). Uno de los genes regulados negativamente por Lov es el PIGF (**FIG. 16**). Esta proteína estimula la angiogénesis e induce la polarización de los TAM hacia fenotipo M2 en el tumor (Roy et al., 2005; Rolny et al., 2011). Por otra parte, la Lov induce la expresión del neuropeptido Y (NPY), el cual es un potente factor de crecimiento de EC y VSMC, siendo un factor pro-angiogénico (Lee et al., 2003). El tratamiento con Lov por tanto participaría en establecer un equilibrio entre los factores angiogénicos dentro del MT. En este trabajo nos centramos en estudiar la actividad del PIGF como regulador de la polarización de los TAM; y proponemos que la inhibición de la polarización de estos hacia un fenotipo M2 se debe en parte a la regulación negativa mediada por Lov del PIGF.

Otro de los genes regulados por Lov fue el de la enzima SOD3 (**Tabla 8**), la cual es responsable de controlar la formación de ROS y RNS en la matriz extracelular. A través de la regulación de estas especies reactivas, ejerce un importante papel en la remodelación vascular. En tumores, el estrés oxidativo/nitrosativo induce un programa transcripcional que promueve la desregulación de la vasculatura y deteriora la función de los vasos sanguíneos (Goel et al., 2011). Sin embargo, el papel de la SOD3 en tumorigénesis es controvertido y su actividad en la vasculatura tumoral desconocida. Nos centramos pues en estudiar en profundidad la función de la SOD3 en el endotelio tumoral.

2. SOD3 mejora la quimioterapia y reduce la permeabilidad vascular

La SOD3 se expresa específicamente en tejidos como pulmón, corazón, riñón y vasos sanguíneos (Kinnula y Crapo, 2004), mientras que se silencia en algunos tipos de cáncer, como mama, pulmón, piel, próstata, páncreas y colorectal (Cammarota et al., 2015; Singh y Bhat, 2012; Svensk et al., 2004; Wheeler et al., 2003; Cammarota et al., 2015; Teoh-Fitzgerald et al., 2014). En ratones Tg-neu, observamos que la SOD3 es altamente expresada en la glándula mamaria, mientras que se regula negativamente en tumores de mama (**FIG. 18**). Parece ser, por tanto, que el silenciamiento de la SOD3 está relacionado con la progresión de algunos tumores, aunque su papel en cáncer no está completamente estudiado. Algunos datos indican una fuerte conexión entre la SOD3 y la regulación del

crecimiento celular causada por un circuito de retroalimentación positiva entre esta enzima, la activación de pequeñas GTPasas y de la vía de señalización RAS-ERK1/2 (Laukkanen, 2016). Estudios *in vitro* sugieren que existe una correlación entre los niveles de ARNm de la SOD3 y el oncogén RAS. La expresión de la SOD3 aumenta cuando los niveles de activación de RAS son bajos; mientras que disminuye cuando la activación de RAS aumenta 10 veces (Cammarota et al., 2015). Estos datos sugieren que la SOD3 podría usarse como un marcador de diferenciación tumoral. La re-expresión de la SOD3 en el parénquima tumoral de aquellos cánceres con baja expresión podría ser una posible diana terapéutica. En este trabajo observamos que el tratamiento con Lov de ratones Tg-neu aumentó los niveles de la SOD3 no sólo en las células tumorales, sino también en las células del estroma, en concreto en las EC (**FIG. 18**). Debido a que nuestro interés iba dirigido al estudio de la influencia del estroma sobre la evolución tumoral, nos centramos en determinar la función de la SOD3 en las EC.

En todos los modelos utilizados, observamos que el aumento en los niveles de SOD3 en el tumor induce cambios funcionales y estructurales en la vasculatura asociada al mismo. En primer lugar, la inducción de la SOD3 (mediante el tratamiento con Lov o con adenovirus) mejoró la eficiencia de la quimioterapia aumentando el contenido en doxo tanto en los tumores Tg-neu como en los LLC (**FIG. 20 y 24**). En ambos casos, este aumento en la acumulación de doxo se podría explicar por la normalización de los vasos sanguíneos por la SOD3. Esta remodelación de la red vascular se reflejó principalmente en un aumento en el área CD31⁺ (**FIG. 21 y 25**) y en una disminución en la permeabilidad (**FIG. 21**). La expresión de la SOD3 puede afectar a la permeabilidad de los vasos sanguíneos a través de la regulación negativa de VEGF (Wheeler et al., 2003). Sin embargo, en los tumores Tg-neu, no observamos cambios en la expresión de VEGF que se correspondieran con el aumento de SOD3 inducido por Lov (**FIG. 16**). La permeabilidad de los vasos sanguíneos está también regulada por las uniones adherentes célula-célula, uno de cuyos principales componentes es la VEC (Dejana et al., 2008). El aumento en los niveles de la SOD3 tanto *in vivo* (tumores LLC) como *in vitro* (células 1G11) indujo la transcripción de la VEC en el endotelio (**FIG. 22, 26 y 28**), la cual desempeña un papel fundamental en la función de barrera endotelial y en la integridad de la estructura de los vasos sanguíneos (Giannotta et al., 2013). Además, la VEC regula negativamente la señalización de VEGF a través de la inhibición de la internalización del receptor de tipo 2 de VEGF (Lampugnani et al., 2006). Por lo que podría haber un bloqueo en la señalización de VEGF en las células donde se induce la VEC por la SOD3. Proponemos que la regulación de la eficiencia de la quimioterapia y de la permeabilidad de los vasos sanguíneos es consecuencia de la inducción de la VEC por la SOD3.

Una de las consecuencias de la actividad enzimática de la SOD3 es el aumento en la biodisponibilidad del NO, así como su acumulación alrededor de los vasos sanguíneos en tumores (**FIG. 29**). El NO es una molécula clave en la regulación de la permeabilidad de las EC a través de la fosforilación de la VEC (Di Lorenzo et al., 2013). Además, la localización del NO cerca de los vasos es importante para la estabilización del endotelio tumoral (Kashiwagi et al., 2008). Postulamos aquí que el aumento en la biodisponibilidad del NO gracias a la actividad enzimática de la SOD3 induce la transcripción de la VEC. Este efecto se traduce en la reducción de la permeabilidad del endotelio. En sintonía con esta hipótesis observamos que la regulación de la transcripción de la VEC es dependiente del NO (**FIG. 30**), ya que el uso de un donante de NO potencia la actividad de su promotor. Mientras que el uso de un inhibidor de las NOS redujo la transcripción de la misma (**FIG. 30**). Por el contrario, dosis altas del donante de NO inhiben la expresión de la VEC. Este doble efecto sobre la transcripción de la VEC puede ser debido a que el NO altera la organización de la VEC de una forma dependiente de dosis (Fukumura et al., 2006; González et al., 2003). Además, ensayos de permeabilidad *in vitro* con un mutante catalíticamente inactivo de la SOD3 demostraron que la reducción de dicha permeabilidad dependía de su actividad enzimática (**FIG. 31**). Todos estos resultados apoyan la idea de que la SOD3, a través del NO, induce la expresión de la VEC, la cual participa en las uniones célula-célula reduciendo así la permeabilidad de los vasos sanguíneos (**FIG. 45**). En muestras humanas de CRC también observamos una correlación entre los niveles de ARNm de la SOD3 y de la VEC en dos cohortes independientes (**FIG. 32**).

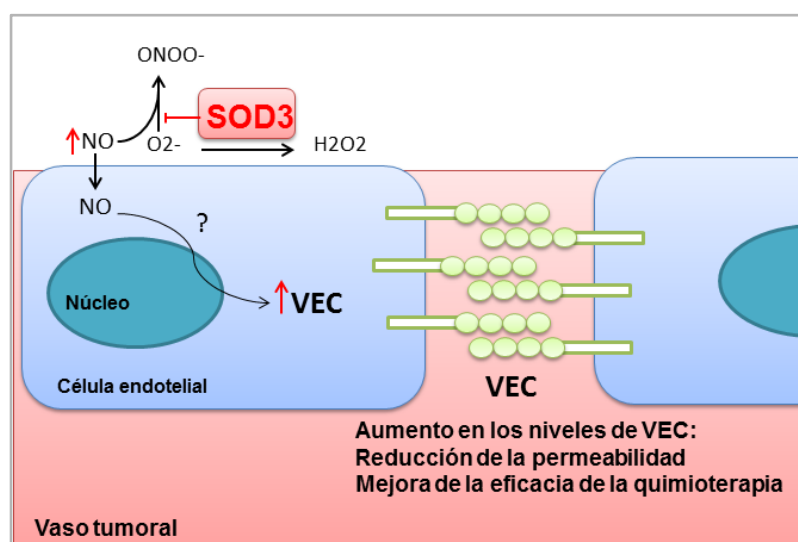


Figura 45. Regulación de la permeabilidad de los vasos sanguíneos tumorales por SOD3. La acumulación de la SOD3 en el endotelio del tumor aumenta - gracias a su actividad enzimática - la biodisponibilidad del NO, el cual induce la expresión de la VEC.

Proponemos que la regulación del eje SOD3-NO-VEC puede ser una estrategia para mejorar la eficiencia de la quimioterapia.

3. SOD3 induce la adhesión y migración de linfocitos T al tumor

La red de vasos sanguíneos aberrantes de un tumor actúa como una barrera que impide la adhesión y extravasación de linfocitos (Ryschich et al., 2002; Hamzah et al., 2008), mientras que su normalización aumenta específicamente la infiltración de células linfoides que promueven una respuesta antitumoral. Otro de los hallazgos de este trabajo fue la identificación de la SOD3 como mediador de la adhesión y migración específica de leucocitos en el tumor. El aumento en los niveles de esta enzima en tumores LLC mediante Lov o adenovirus potenció específicamente la migración de las células T, observándose una tendencia a la reducción en la migración de las células mieloides CD11b⁺ (**FIG. 23 y 33**).

Existe cierta discrepancia sobre el papel de la SOD3 en el sistema immune. Numerosos estudios indican que la SOD3 altera el estado inflamatorio del tejido dañado, pero su mecanismo de acción no se ha definido (Folz et al., 1999; Laukkanen et al., 2001; Laukkanen et al., 2002). Algunos estudios sugieren que los niveles elevados de esta enzima reducen la formación de metabolitos quimioatrayentes para células polimorfonucleares y macrófagos (Folz et al., 1999). También existen evidencias de que los aniones superóxido inducen la adhesión de leucocitos (Cartwright et al., 1997). Por otro lado, se ha descrito que la SOD3 reduce el reclutamiento de células del sistema immune al sitio de inflamación (Laurila et al., 2009). Como se menciona anteriormente, nuestro interés va dirigido a estudiar la función de la SOD3 en el endotelio. Por lo tanto, analizamos el efecto de sobreexpresar dicha enzima específicamente en las EC (1G11-mock y 1G11-SOD3) sobre la adhesión y migración de leucocitos. En este modelo *in vitro*, la sobreexpresión de esta enzima en las EC potenció específicamente la adhesión y migración de células CD3⁺ (**FIG. 34**). En el caso de las células mieloides CD11b⁺, se apreció un ligero descenso en su adhesión y migración (**FIG. 34**). Observamos que la sobreexpresión de SOD3 cambió el perfil de expresión de unos 800 genes las EC. Mediante la base de datos *panther* analizamos los procesos biológicos que estaban alterados (**FIG. 35**). Entre los procesos inducidos y reprimidos por la SOD3, la vía de señalización por integrinas y la vía de inflamación mediada por quimioquinas y citoquinas, respectivamente, eran las mejores representadas (**FIG. 35**). Ambas podrían explicar los cambios en adhesión y migración de linfocitos que hemos observado. Nos centramos en estudiar el patrón de expresión de las quimioquinas diferencialmente reguladas por la SOD3, siendo CCL2 y CCL7 las más reprimidas (**FIG. 35**). Ambas quimioquinas regulan el reclutamiento de las MDSCs y otras células mieloides en tumores, las cuales promueven el crecimiento tumoral y la metástasis en cáncer de mama, ovario y próstata (Fader et al., 2010; Qian et al., 2011; Zhang et al., 2010). La inhibición de la señalización por CCL2 da como resultado una infiltración reducida de MDSCs, una reversión del estado inmunosupresor y una activación de células efectoras tumoricidas

(Chun et al., 2015; Li et al., 2013; Loberg et al., 2007). En muchos tipos de cáncer, estas células disminuyen la efectividad de la inmunoterapia, aumentando la producción de ROS y RNS (Muller, 2010). Además, suprimen la activación y proliferación de las células T (Gabrilovich y Nagaraj, 2009). Por tanto, disminuyendo los niveles de CCL2 en el tumor se reduce la acumulación de MDSCs. Por otro lado, la elevada producción de RNS en el tumor induce la nitración de CCL2, lo cual inhibe la infiltración de células T (Molon et al. 2011). La SOD3 no sólo inhibe la transcripción de CCL2 sino que también disminuye los niveles de RNS en el MT, lo que podría prevenir la nitración de dicha quimioquina. Planteamos la idea de que la SOD3, a través de la inhibición de la expresión de CCL2 en las EC, reduce la infiltración de MDSCs, aumentando así la proliferación y migración de las células T.

La expresión de CCL2 está regulada por una red compleja de factores de transcripción, incluyendo NF- κ B, C/EBP, AP-1, y Sp-1 (Yadav et al., 2010). NF- κ B es un mediador clave de la inflamación por la inducción en la expresión de genes pro-inflamatorios, tales como TNF α e IL1 α , y moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 (Denk et al., 2001). En otros estudios se ha descrito que la sobreexpresión de la SOD3 se correlaciona con una atenuación en la actividad de NF- κ B (Azevedo et al., 2000; Hayashi et al., 2008; Laurila et al. 2009). Mediante análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA), observamos que la mayoría de los genes diana de NF- κ B se regulaban negativamente en las células 1G11-SOD3 (**FIG. 35**). Para validar este dato, demostramos que la sobreexpresión de la SOD3 inhibe la actividad de NF- κ B previniendo su translocación al núcleo en células 1G11 (**FIG. 36**).

Nos pareció muy interesante investigar cómo una enzima extracelular impedía la localización de NF- κ B en el núcleo. En un estudio previo se demostró que la SOD3 atenuaba la actividad NF- κ B debido en parte a un aumento en la expresión del inhibidor I κ B α (Laurila et al. 2009). Observamos aquí, sin embargo, que la expresión del gen de I κ B α no cambiaba cuando se sobreexpresaba la SOD3 (**FIG. 37**). Sin embargo, sí observamos un aumento de esta proteína en las EC que sobreexpresaban la SOD3 (**FIG. 37**). Consideramos que esta enzima debe mediar en un mecanismo de regulación post-transcripcional que afecta al procesamiento de I κ B α . La degradación de esta proteína por el proteosoma está precedida por la adición de cadenas de ubiquitina (Oeckinghaus y Ghosh, 2009). Observamos que en las células 1G11-SOD3 la ubiquitinación de I κ B α fue notablemente menor que en las células 1G11-mock (**FIG. 37**). Se inicia aquí el estudio del mecanismo por el cual la SOD3 atenúa la actividad de NF- κ B, a través de la inhibición de la degradación de I κ B α . Esta inhibición puede ocurrir por varios mecanismos: 1) bloqueo o atenuación del proceso de fosforilación de I κ B α ; 2) inhibición del proceso de ubiquitinación, en el que está implicado el complejo E3 ubiquitina ligasa; ó 3) fallo en la maquinaria de

degradación a través del proteosoma. El estudio de esta regulación requiere futuras investigaciones.

Por otro lado, y dada la gran influencia de NF- κ B en la regulación del tráfico leucocitario, consideramos la posibilidad de que la SOD3, a través de su inhibición, regule la migración de células T al tumor. En línea con esta hipótesis, observamos que la inhibición farmacológica de NF- κ B en EC, aumentó la adhesión y migración de células CD3⁺, reduciendo la de células CD11b⁺ (FIG. 38).

Este resultado sugiere que la SOD3, inhibiendo la activación del factor de transcripción NF- κ B, produce cambios en la adhesión y migración de los leucocitos sobre las EC que podrían explicar el efecto sobre la infiltración que hemos descrito en tumores (FIG. 46).

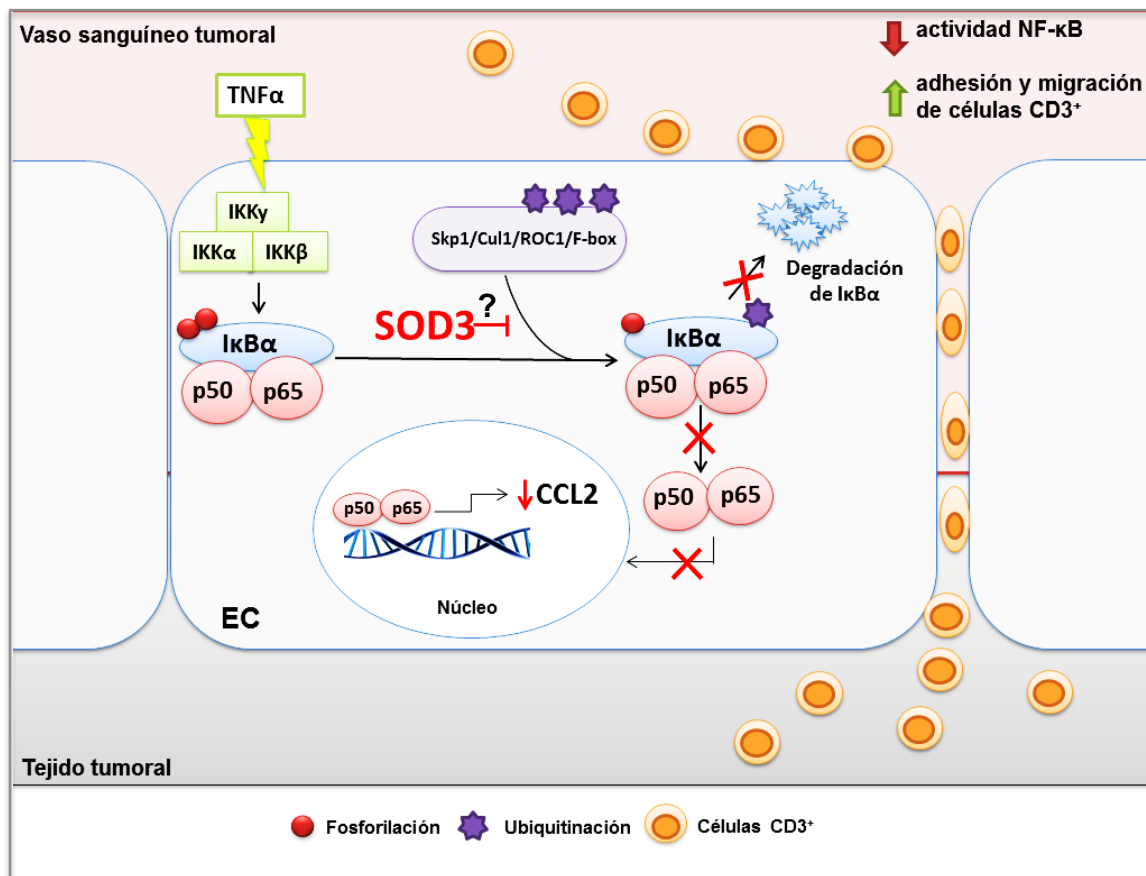


Figura 46. Regulación de la activación de NF- κ B y de la adhesión y migración de células CD3⁺ por la SOD3. En presencia de elevados niveles de SOD3 dentro de la EC, a pesar del estímulo con TNF α , se inhibe la ubiquitinación y degradación de I κ B α . Esto se traduce en una menor translocación de NF- κ B al núcleo y una disminución en la expresión de CCL2. Por otro lado, el bloqueo en la señalización de NF- κ B resulta en un aumento en la adhesión y migración de células CD3⁺.

4. SOD3 regula NF- κ B cuando es secretada vía exosomas

La SOD3 es expresada principalmente por fibroblastos y células del músculo liso (Stralin, 1995) y no tanto por las EC. Sin embargo, puede ser endocitada por las EC a través de su unión a heparan sulfato (Chu et al., 2006) y a fibulina-5 (Andrew et al., 2004). Esta proteína podría ejercer su acción de forma autocrina y paracrina secretándose al medio extracelular y transportándose hacia otras células donde se ancla y endocita.

Estudiamos si la adición de la SOD3 exógena, que simula un modelo paracrino, regula la actividad NF- κ B. Generamos dos fuentes exógenas de proteína: medio de cultivo enriquecido en la SOD3 extracelular y SOD3 recombinante purificada a homogeneidad a partir de ese medio. Tras demostrar que las EC endocitan SOD3 en ambos casos (**FIG. 40**), analizamos los niveles de ARNm de CCL2 como gen reportero de la actividad NF- κ B. Sorprendentemente sólo cuando las células se incubaban con el medio enriquecido en la SOD3 disminuía la expresión de CCL2 (**FIG. 41**). Este resultado nos impulsó a plantear la hipótesis de que la SOD3 necesite algún componente del medio extracelular para regular la actividad de NF- κ B.

Numerosos estudios han mostrado que existe una vía de comunicación a través de la secreción de exosomas (Su et al., 2017). Los exosomas son vesículas extracelulares que pueden ser transportados de una célula donadora a una célula receptora transfiriendo información genética y proteínas efectoras entre estas células (Valadi et al., 2007). Esta comunicación vía exosomas adquiere gran importancia en procesos de remodelación de los vasos sanguíneos, ya que participan en la transferencia de moléculas reguladoras de la función vascular (Umezu et al., 2014; Tadokoro et al., 2013). Un ejemplo es la regulación de STAT3 en las células endoteliales a través de los exosomas derivados de las células estromales mesenquimales (Lee et al., 2012). En base a estos datos, y teniendo en cuenta que la adición del medio extracelular enriquecido en SOD3, y no la proteína purificada, regula la activación de NF- κ B en células endoteliales, nos planteamos la posibilidad de que la SOD3 se secrete vía exosomas.

En este trabajo se ha demostrado por primera vez, tanto mediante técnicas moleculares como citoquímicas, que la SOD3 se secreta al medio extracelular, al menos en parte, contenida en exosomas (**FIG. 42**). Además determinamos que la inhibición de NF- κ B en las EC era dependiente de la adición de SOD3 en exosomas, y no la proteína purificada (**FIG. 43**). Esto puede ser debido a que la endocitosis de la SOD3 purificada ocurre mediante la vía de endocitosis dependiente de clatrina, que finalmente culmina en la degradación de la proteína (Chu et al., 2006). Sin embargo, mediante el transporte en exosomas la SOD3 puede liberarse al citosol –donde tiene lugar el proceso de regulación de

NF- κ B- mediante fusión de membranas. Por tanto podemos concluir que la inhibición de la actividad NF- κ B a través de la SOD3 en las EC precisa de la localización de esta enzima en exosomas.

Una de las aproximaciones que llevamos a cabo para entender cómo ésta proteína contenida en exosomas es capaz de regular la actividad NF- κ B, fue el análisis de las proteínas que interaccionan con SOD3 en las EC. El análisis del interactoma de la SOD3 mediante LC-MS/MS identificó 588 proteínas, de las cuales 41 mostraron alta probabilidad de interacción con SOD3 (**FIG. 44**). La mayoría de estas proteínas se localizan en la matriz extracelular (sindecano-1 y -2, glipicano-6, y fibulinas -1, -2 y -5) y en exosomas (filamina B, sindecano-4, EFEMP1). Otra fracción importante de proteínas se localizaban en el citosol y el núcleo, como es el caso del factor de transcripción E3, el factor 2 de expresión de mielina, galectina-9 y la proteína CAND1. Estos resultados están en concordancia con lo descrito en otros trabajos, ya que la localización principal de la SOD3 en los tejidos es la matriz extracelular y sobre la superficie celular (Marklund, 1984-a; Marklund, 1984-b; Myung-Ja et al., 2012; Nguyen et al., 2004), y también se localiza en el núcleo (Ookawara et al., 2003). Además, la identificación de proteínas de interacción con la SOD3 en exosomas refuerza nuestro resultado de que SOD3 se localiza, al menos en parte, en exosomas.

Hipotetizamos de que la interacción de SOD3 y CAND1 puede ser importante en la regulación de NF- κ B por la SOD3. CAND1 es una proteína que regula la formación de los complejos SCF (SKP1, CUL1, proteínas F box) E3 ubiquitin ligasa que controlan los niveles de proteínas I κ B, entre otras (Zheng et al., 2002). Sugerimos que la asociación de SOD3 a CAND1 podría regular la actividad de los complejos SCF E3 ubiquitin ligasa a través de varios mecanismos. Una posibilidad es que la SOD3 establezca la unión de CAND1 a CUL1. La interacción SOD3/CAND1/CUL1 impide la formación del complejo SCF, lo que conllevaría a la inhibición de la poliubiquitinación de I κ B α . Otra posibilidad es que la SOD3 secuestre a CAND1, evitando su asociación con CUL1. La unión de CAND1 a CUL1 por un lado estabiliza los niveles de las proteínas F box y por otro lado induce el ensamblaje de los complejos SCF para los cuales hay sustrato disponible (Pierce et al., 2013). La unión de SOD3 a CAND1 potenciaría la destrucción de las proteínas F box, ya que la unión de éstas a CUL1 induce su propia degradación cuando no hay sustrato disponible; en último término esto prevendría la ubiquitinación de las proteínas I κ B α . No obstante, es necesaria la validación de la interacción SOD3/CAND1 en futuras investigaciones, así como de otras de las proteínas del análisis elegidas en base a su posible función en la regulación de la actividad de NF- κ B.

En resumen, en este trabajo se ha identificado a la SOD3 como una proteína reguladora de la función endotelial en tumores. Esto es debido a que participa en la remodelación de los vasos sanguíneos y reduce la permeabilidad del endotelio a través del eje de regulación SOD3/NO/VEC. Además participa en la regulación de la migración de leucocitos a través de la inhibición de NF- κ B. Esta actividad depende de la secreción de SOD3 en exosomas. Esta tesis abre una línea de investigación en el grupo con el fin de clarificar cómo SOD3 regula la actividad de los complejo culina/F-box y la ubiquitinación de I κ Ba. Esto puede ser relevante desde el punto de vista traslacional, ya que hemos demostrado que SOD3 modifica la función y composición del estroma para mejorar la eficacia tanto de la quimioterapia como la inmunoterapia.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento con lovastatina induce la normalización de los vasos sanguíneos tumorales en el modelo de tumor espontáneo de ratón MMTVneu. Esta remodelación de la red vascular mejora la eficiencia de la quimioterapia y modula la respuesta inflamatoria hacia una inmunidad antitumoral, aumentando la infiltración de linfocitos T CD8⁺ en el tumor e inhibiendo la polarización de los TAM hacia fenotipo M2.
2. Se ha identificado un programa genético inducido por lovastatina relacionado con los cambios en la angiogénesis y en la respuesta inflamatoria. Destacamos la inhibición en la expresión del PIGF que media en la polarización de los macrófagos y la inducción de la enzima superóxido dismutasa extracelular (SOD3).
3. La inducción en la expresión de la SOD3 por lovastatina en el parénquima tumoral aumenta la eficiencia de la quimioterapia, reduce la permeabilidad de los vasos sanguíneos tumorales y estimula una respuesta inflamatoria caracterizada por el aumento en la infiltración de células T CD3⁺.
4. El aumento en los niveles de la SOD3 específicamente en las células endoteliales reduce la permeabilidad del endotelio a través del aumento en la expresión de la VEC. Esta inducción en la transcripción de esta proteína es dependiente del aumento en la biodisponibilidad del NO resultado de la actividad enzimática de la SOD3.
5. SOD3 inhibe la vía de activación canónica del factor de transcripción NF-κB en las células endoteliales previniendo la ubiquitinación y degradación de su inhibidor IκBα.
6. La sobreexpresión de la SOD3 y la inhibición farmacológica de NF-κB en las células endoteliales inducen un aumento en la adhesión y trans migración de células CD3⁺.
7. La SOD3 se libera al medio extracelular en exosomas y su actividad sobre la inhibición de NF-κB en células endoteliales requiere de su localización en estas microvesículas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, Li M, Ichim TE, Chin JL, Min WP** (2005). Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood cells, molecules & diseases*.; 35:169-173.
- Adachi T, Hara H, Yamada H, Yamazaki N, Yamamoto M, Sugiyama T, Futenma A, katagiri Y** (2001). Heparin-stimulated expression of extracellular superoxide dismutase in human fibroblasts. *Atherosclerosis*.; 159:307-312.
- Agarwal B, Bhendwal S, Halmos B, Moss SF, Ramey WG, Holt PR** (1999). Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res*.; 5:2223-9.
- Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J** (2009). Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.; 106:3794-3799.
- Alon, R. & Feigelson, S. W** (2012). Chemokine-triggered leukocyte arrest: force-regulated bi-directional integrin activation in quantal adhesive contacts. *Curr. Opin. Cell Biol*.;24:670-676.
- Amati B, Vlach J** (1999). Kip1 meets SKP2: new links in cell-cycle control. *Nat Cell Biol*.;1:E91-3.
- Andrew D. Nguyen, Shinichi Itoh, Viktoria Jeney, Hiromi Yanagisawa, Mitsuaki Fujimoto, Masuko Ushio-Fukai, Tohru Fukai** (2004). Fibulin-5 Is a Novel Binding Protein for Extracellular Superoxide Dismutase. *Circulation Research*.; 95:1067-1074.
- Andriana Margariti, Bernhard Winkler, Eirini Karamariti, Anna Zampetaki, Tsung-neng Tsai, Dilair Baban, Jiannis Ragoussis, Yi Huang, Jing-Dong J. Han, Lingfang Zeng, Yanhua Hu, Qingbo Xu** (2012). Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue-engineered vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A*.; 109: 13793-13798.
- Arjaans M, Schröder CP, Oosting SF, Dafni U, Kleibeuker JE, de Vries EG** (2016). VEGF pathway targeting agents, vessel normalization and tumor drug uptake: from bench to bedside. *Cell*.;131:463-75.
- Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, Reyburn HT** (2010). Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res*.;70:481-9.
- Assaf Marcus, Benjamin G. Gowen, Thornton W. Thompson, Alexandre Iannello, Michele Ardolino, Weiwen Deng, Lin Wang, Nataliya Shifrin, and David H. Raulet** (2014). Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol*.; 122: 91-128.
- Azevedo LC, Pedro MA, Souza LC, de Souza HP, Janiszewski M, da Luz PL, Laurindo FR** (2000). Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis. *Cardiovasc Res*.; 47: 436-445.
- Baish JW, Jain RK** (2000). Fractals and cancer. *Cancer Res*.; 60:3683-8.
- Benakanakere I, Johnson T, Sleightholm R, Villeda V, Arya M, Bobba R, Freter C, Huang C** (2014). Targeting cholesterol synthesis increases chemoimmuno-sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells. *Exp Hematol Oncol*.; 3: 24.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y** (1995). Controlling the false discovery rate. *J R Stat Soc Ser C Appl Stat* 57, 289-300.
- Bergmann C, Wild CA, Narwan M, Lotfi R, Lang S, Brandau S** (2011). Human tumor-induced and naturally occurring treg cells differentially affect NK cells activated by either IL-2 or target cells. *Eur J Immunol*.;41:3564-3573.
- Björkstén B, Marklund S, Hägglöf B** (1984). Enzymes of leukocyte oxidative metabolism in Down's syndrome. *Acta Paediatr Scand*.; 73:97-101.

Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, Hivroz C (2002). TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol.*; 168:3235-3241.

Boucher, Y. & Jain, R. K (1992). Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse. *Cancer Res.*; 52:5110-5114.

Breland, U.M.; Halvorsen, B.; Hol, J.; Oie, E.; Paulsson-Berne, G.; Yndestad, A.; Smith, C.; Otterdal, K.; Hedin, U.; Waehre, T.; Sandberg, W.J.; Froland, S.S.; Haraldsen, G.; Gullestad, L.; Damas, J.K.; Hansson, G.K. and Aukrust, P (2008). A potential role of the CXC chemokine GROalpha in atherosclerosis and plaque destabilization: downregulatory effects of statins. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.*; 28:1005-1011.

Broady, R. and Levings, M.K (2008). Graft-versus-host disease: suppression by statins. *Nat. Med.*; 14:1155-1156.

Bronner LL, Kanter DS and Manson JE (1995). Primary prevention of stroke. *N Engl J Med.*; 333: 1392-1400.

Brown MS, Goldstein JL (1990). Lipoprotein receptors: therapeutic implications. *J Hypertens Suppl.*; 8:S33-5.

Bruno, A. Pagani, E. Magnani, T. Rossi, D.M. Noonan, A.R. Cantelmo, A. Albini (2014). Inflammatory angiogenesis and the tumor microenvironment as targets for cancer therapy and prevention. *Cancer Treat. Res.*; 159:401-426.

Bueno MJ, Mounon S, Quintela-Fandino M (2017). Personalising and targeting antiangiogenic resistance: a complex and multifactorial approach. *Br J Cancer.*; 1169:1119-1125.

Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Díaz C, Hernández G, Egidio J (1998). HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.*; 32:2057-64.

Cammarota F, de Vita G, Salvatore M, Laukkanen MO (2015). Ras oncogene-mediated progressive silencing of extracellular superoxide dismutase in tumorigenesis. *BioMed Research International.*; 2015:780409.

Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL (1995). Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 92:6264-8.

Carmeliet P (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.*; 438:932-936.

Carmeliet P & Jain RK (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.*; 407:249-257.

Carmeliet P & Jain RK (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery.*; 10:417-427.

Carmody RJ, Ruan Q, Palmer S, Hilliard B, Chen YH (2007). Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade. *Science.*; 317:675-8.

Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM and Pascual-Montano A (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.*; 8: R3.

Cartwright JE, Whitley GS, Johnstone AP (1997). Endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion to endothelial cells: effect of nitric oxide. *Exp Cell Res.*; 235:431-4.

Castellone MD, Langella A, Cantara S, Laurila JP, Laatikainen LE, Bellelli R, Pacini F, Salvatore M, Laukkanen MO (2014). Extracellular superoxide dismutase induces mouse embryonic fibroblast proliferative burst, growth arrest, immortalization, and consequent in vivo tumorigenesis. *Antioxidants & Redox Signaling.*; 21:1460-1474.

- Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JP, Boireau W, Rouleau A, Simon B, Lanneau D, De Thonel A, Multhoff G, Hamman A, Martin F, Chauffert B, Solary E, Zitvogel L, Garrido C, Ryffel B, Borg C, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F** (2010). Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *The Journal of clinical investigation.*; 120:457-471.
- Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N** (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumormicroenvironment. *Cancers (Basel).*; 6:1670-90.
- Che M, Wang R, Li X, Wang HY, Zheng XF** (2016). Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov Today.*;21:143-9.
- Chen Y, Zhang S, Peng G, Yu J, Liu T, Meng R, Li Z, Zhao Y, Wu G** (2013). Endothelial NO synthase and reactive oxygen species mediated effect of simvastatin on vessel structure and function: pleiotropic and dose-dependent effect on tumor vascular stabilization. *Int J Oncol.*; 42:1325-36.
- Chu Y, Piper R, Richardson S, Watanabe Y, Patel P, Heistad DD** (2006). Endocytosis of extracellular superoxide dismutase into endothelial cells: role of the heparin-binding domain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;26:1985-90.
- Chun E, Lavoie S, Michaud M, Gallini CA, Kim J, Soucy G, Odze R, Glickman JN, Garrett WS** (2015). CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. *Cell Rep.*;12:244-57.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM** (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.*;91:3527-61.
- Coimbra M, Banciu M, Fens MH, de Smet L, Cabaj M, Metselaar JM, Storm G, Schiffelers RM** (2010). Liposomal pravastatin inhibits tumor growth by targeting cancer-related inflammation. *J Control Release.*;148:303-310.
- Cordle, A.; Koenigsknecht-Talboo, J.; Wilkinson, B.; Limpert, A. and Landreth, G** (2005). Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function. *J. Biol. Chem.*; 280: 34202-34209.
- Crawford, Y. & Ferrara, N** (2009). VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. *Cell Tissue Res.*; 335:261-269.
- Crosby CV, Fleming PA, Argraves WS, Corada M, Zanetta L, Dejana E, Drake CJ** (2005). VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly. *Blood.*;105:2771-6.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W** (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.*;10:942-94.
- Damuzzo V, Pinton L, Desantis G, Solito S, Marigo I, Bronte V, Mandruzzato S** (2015). Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells. *Cytometry B Clin. Cytom.*; 88:77-91.
- Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR** (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.*; 14:986-95.
- De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA** (2000). The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 20:e83-e88.
- Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG** (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of Cell Science.*;121:2115-2122.

Demierre, M.F.; Higgins, P.D.; Gruber, S.B.; Hawk, E. and Lippman, S.M (2005). Statins and cancer prevention. *Nat. Rev. Cancer.*; 5:930-942.

Demory Beckler M1, Higginbotham JN, Franklin JL, Ham AJ, Halvey PJ, Imasuen IE, Whitwell C, Li M, Liebler DC, Coffey RJ (2013). Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol Cell Proteomics.*;12:343-55.

Denk A, Goebeler M, Schmid S, Berberich I, Ritz O, Lindemann D, Ludwig S, Wirth T (2001). Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. *J Biol Chem.*;276: 28451-28458.

Di Lorenzo A, Lin MI, Murata T, Landskroner-Eiger S, Schleicher M, Kothiya M, Iwakiri Y, Yu J, Huang PL, Sessa WC (2013). eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases. *J Cell Sci.*;126:5541-52.

Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rütten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM (2001). HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest.*; 108:391-7.

Dong QG, Bernasconi S, Lostaglio S, De Calmanovici RW, Martin-Padura I, Breviario F, Garlanda C, Ramponi S, Mantovani A, Vecchi A (1997). A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;17:1599-604.

Drucker L, Afensiev F, Radnay J, Shapira H, Lishner M (2004). Co-administration of simvastatin and cytotoxic drugs is advantageous in myeloma cell lines. *Anticancer Drugs.*; 15:79-84.

Dulak J, Józkwicz A (2005). Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.*;5:579-94.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.*; 3: 991-998.

Edlund A, Edlund T, Hjalmarsson K, Marklund SL, Sandström J, Strömqvist M, Tibell L (1992). A non-glycosylated extracellular superoxide dismutase variant. *Biochem J.*; 288:451-6.

Ehrlich P (1909). Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk.*;5:73-290.

Emiko Fujita, Akira Shimizu, Yukinari Masuda, Naomi Kuwahara, Takashi Arai, Shinya Nagasaka, Kaoru Aki, Akiko Mii, Yasuhiro Natori, Yasuhiko Iino, Yasuo Katayama and Yuh Fukuda (2010). Statin Attenuates Experimental Anti Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis Together with the Augmentation of Alternatively Activated Macrophages. *Am J Pathol.*; 177: 1143-1154.

Emilie Roudier, Oras Mistafa and Ulla Stenius (1999). Statins induce mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated inhibition of Akt signaling and sensitize p53-deficient cells to cytostatic drugs. *Clin Cancer Res.*; 5:2223-9.

Endo A (2010). A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*;86:484-93.

Fader AN, Rasool N, Vaziri SA, Kozuki T, Faber PW, Elson P, Biscotti CV, Michener CM, Rose PG, Rojas-Espaillet L, Belinson JL, Ganapathi MK, Ganapathi R (2010). CCL2 expression in primary ovarian carcinoma is correlated with chemotherapy response and survival outcomes. *Anticancer Res.*;30:4791-8.

Feleszko W, Jakóbisiak M (2000). Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res.*; 6:1198-9.

Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, Zhou Q, Sui SF (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic.*; 11:675-687.

Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, Autiero M, Wyns S, Plaisance S, Moons L, van Rooijen N, Giacca M, Stassen JM, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P (2007). Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*;131:463-75.

Fischer, C., Mazzone, M., Jonckx, B. & Carmeliet, P (2008). FLT1 and its ligands VEGFB and PIGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nature Rev. Cancer*; 8:942-956.

Folkman J (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*; 285:1182-1186.

Folz RJ, Abushamaa AM, Suliman HB (1999). Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia. *J Clin Invest*;103: 1055-1066.

Folz RJ, Peno-Green L, Crapo JD (1994). Identification of a homozygous missense mutation (Arg to Gly) in the critical binding region of the human EC-SOD gene (SOD3) and its association with dramatically increased serum enzyme levels. *Hum Mol Genet*;3:2251-4.

Frank Winkler, Sergey V. Kozin, Ricky T. Tong, Sung-Suk Chae, Michael F. Booth, Igor Garkavtsev, Lei Xu, Daniel J. Hicklin, Dai Fukumura, Emmanuelle di Tomaso, Lance L. Munn, and Rakesh K. Jain (2004). Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: Role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer cell*; 6:553-63.

Frederiksen LJ, Siemens DR, Heaton JP, Maxwell LR, Adams MA, Graham CH (2003). Hypoxia induced resistance to doxorubicin in prostate cancer cells is inhibited by low concentrations of glyceryl trinitrate. *J Urol*;170:1003-7.

Fujita E, Shimizu A, Masuda Y, Kuwahara N, Arai T, Nagasaka S, Aki K, Mii A, Natori Y, Iino Y, Katayama Y, Fukuda Y (2010). Statin attenuates experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis together with the augmentation of alternatively activated macrophages. *Am J Pathol*;177:1143-54.

Fukai T, Ushio-Fukai M (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*;15:1583-606.

Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG (2000). Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J. Clin. Invest*; 105:1631-1639.

Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK (2006). The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*; 6:521-34.

Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*;9:162-74.

Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, Multhoff G (2005). Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer research*; 65:5238-5247.

Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefer AM (1995). Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 15:1652-9.

Giannotta M, Trani M, Dejana E (2013). VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell*;26:441-54.

Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev*;91:1071-121.

González D, Herrera B, Beltrán A, Otero K, Quintero G, Rojas A (2003). Nitric oxide disrupts VE-cadherin complex in murine microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*;304:113-8.

- González-Martín A, Gómez L, Lustgarten J, Mira E and Mañes S** (2011). Maximal T Cell-Mediated Antitumor Responses Rely upon CCR5 Expression in Both CD4+ and CD8+ T Cells. *Cancer Res.*; 71: 5455-5466.
- Gory-Fauré S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M, Huber P** (1999). Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development.*; 126:2093-102.
- Greenwood, J. and Mason, J.C** (2007). Statins and the vascular endothelial inflammatory response *Trends Immunol.*; 28: 88-98.
- Greenwood, J.; Steinman, L. and Zamvil, S.S.** (2006). Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat. Rev. Immunol.*; 6:358-370.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M** (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.*; 140:883-899.
- Hamzah J, Jugold M, Kiessling F, Rigby P, Manzur M, Marti HH, Rabie T, Kaden S, Gröne HJ, Hämmerling GJ, Arnold B, Ganss R** (2008). Vascular normalization in Rgs5 deficient tumours promotes immune destruction. *Nature.*; 453:410-414.
- Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM** (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol.*; 156:1363-1380.
- Hayashi T, Yamashita C, Matsumoto C, Kwak CJ, Fujii K, Hirata T, Miyamura M, Mori T, Ukimura A, Okada Y, Matsumura Y, Kitauro Y** (2008). Role of gp91phox-containing NADPH oxidase in left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxic stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 294:H2197-203.
- Hendrickson DJ, Fisher JH, Jones C, Ho YS** (1990). Regional localization of human extracellular superoxide dismutase gene to 4pter-q21. *Genomics.*; 8:736-8.
- Hjalmarsson K, Marklund SL, Engström A, Edlund T** (1987). Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 84:6340-4.
- Hojo S, Koizumi K, Tsuneyama K, Arita Y, Cui Z, Shinohara K, Minami T, Hashimoto I, Nakayama T, Sakurai H, Takano Y, Yoshie O, Tsukada K, Saiki I** (2007). High-level expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Cancer Res.*; 67:4725-4731.
- Honore PM, Jacobs R, Hendrickx I, De Waele E, Van Gorp V, De Regt J, Spapen HD** (2016). Statins and the kidney: Friend or foe? *Blood Purif.*; 43:91-96.
- Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, James BC, Vincent GM, Williams RR** (1996). Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 16:250-5.
- Hurley JH, Odorizzi G** (2012). Get on the exosome bus with ALIX. *Nature cell biology.*; 14:654-655.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F** (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.*; 350:2335-42.
- Ichihara K., Satoh K** (2002). Disparity between angiographic regression and clinical event rates with hydrophobic statins. *Lancet.*; 359: 2195-219.
- Ifergan I, Wosik K, Cayrol R, Kébir H, Auger C, Bernard M, Bouthillier A, Mouldjian R, Duquette P, Prat A** (2006). Statins reduce human blood-brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: relevance to multiple sclerosis. *Ann Neurol.*; 60:45-55.

Igor N Zelko, Thomas J Mariani, Rodney J Folz (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*.;33: 337-349.

Imlay JA (2003). Pathways of Oxidative Damage. *Annual Review of Microbiology*.; 57:395-418.

Jain MK, Ridker PM (2005). Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nat Rev Drug Discov*.;4:977-87.

Jain RK (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med*.; 7:987-989.

Jain RK (2005). Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science*.; 307:58-62.

Jain, R. K (1988). Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res*.; 48:2641-2658.

Jain, R. K (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature Med*.; 7:987-989.

Jain, R.K (1994). Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci. Am*.; 271:58-65.

Jain, R.K (1998). The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nature Med*. 4, 655-657.

Jakobisiak M, Golab J (2003). Potential antitumor effects of statins (Review). *Int J Oncol*.;23:1055-69.

Jakobisiak M, Golab J (2010). Statins can modulate effectiveness of antitumor therapeutic modalities. *Med Res Rev*.; 30:102-35.

Joseph L. Goldstein & Michael S. Brown (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*.; 343, 425-430.

Karin M, Greten FR (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*.; 5:749-59.

Kashiwagi S, Tsukada K, Xu L, Miyazaki J, Kozin SV, Tyrrell JA, Sessa WC, Gerweck LE, Jain RK, Fukumura D (2008). Perivascular nitric oxide gradients normalize tumor vasculature. *Nat Med*.;14:255-7.

Katoh H and Watanabe M (2015). Myeloid-derived suppressor cells and therapeutic strategies in cancer. *Mediators Inflamm*.; 159269.

Kehlen A, Greither T, Wach S, Nolte E, Kappler M, Bache M, Holzhausen HJ, Lautenschläger C, Göbel S, Würl P, Immel UD, Agaimy A, Wullich B, Taubert H (2014). High coexpression of CCL2 and CX3CL1 is gender-specifically associated with good prognosis in soft tissue sarcoma patients. *Int J Cancer*.;135:2096-106.

Kim J, de Sampaio PC, Lundy DM, Peng Q, Evans KW, Sugimoto H, Gagea M, Kienast Y, do Amaral NS, Rocha RM, Eikesdal HP, Lønning PE, Meric-Bernstam F, LeBleu VS (2016). Heterogeneous perivascular cell coverage affects breast cancer metastasis and response to chemotherapy. *JCI Insight*.; 1:e90733.

Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K (2006). Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res*.; 66:5527-36.

Kimura G, Kasahara M, Ueshima K, Tanaka S, Yasuno S, Fujimoto A, Sato T, Imamoto M, Kosugi S, Nakao K (2016). Effects of atorvastatin on renal function in patients with dyslipidemia and chronic kidney disease: assessment of clinical usefulness in CKD patients with atorvastatin (ASUCA) trial. *Clin Exp Nephrol*.; 2: 211-217.

- Kinnula VL, Crapo JD** (2004). Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med.*; 36:718-44.
- Kundu JK, Surh YJ** (2008). Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res.*; 659:15-30.
- Kwon JY, Hong SH, Park SD, Ahn SG, Yoon JH, Kwon BM, Kim SA** (2012). 2'-Benzoyloxycinnamaldehyde inhibits nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via regulation of AP-1 pathway. *Eur J Pharmacol.*;696:179-86.
- Lai YC, Pan KT, Chang GF, Hsu CH, Khoo KH, Hung CH, Jiang YJ, Ho FM, Meng TC** (2011). Nitrite-mediated S-nitrosylation of caspase-3 prevents hypoxia-induced endothelial barrier dysfunction. *Circ Res.*;109:1375-86.
- Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E** (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol.*;174:593-604.
- Lança T, Costa MF, Gonçalves-Sousa N, Rei M, Grosso AR, Penido C, Silva-Santos B** (2013). Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic T lymphocytes to tumor beds. *J Immunol.*;190:6673-80.
- Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Böhm M, Dirnagl U, Endres M** (2000). Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke.*;31:2442-9.
- Laukkanen MO** (2016). Extracellular Superoxide Dismutase: Growth Promoter or Tumor Suppressor? *Oxid Med Cell Longev.* ; 2016:3612589.
- Laukkanen MO, Cammarota F, Esposito T, Salvatore M, Castellone MD** (2015). Extracellular superoxide dismutase regulates the expression of small GTPase regulatory proteins GEFs, GAPs, and GDI. *PLoS ONE.*; 9;10(3):e0121441.
- Laukkanen MO, Kivelä A, Rissanen T, Rutanen J, Karkkainen MK, Leppanen O, Bräsen JH, Ylä-Herttuala S** (2002). Adenovirus-mediated extracellular superoxide dismutase gene therapy reduces neointima formation in balloon-denuded rabbit aorta. *Circulation.*; 106:1999-2003.
- Laukkanen MO, Leppanen P, Turunen P, Tuomisto T, Naarala J, Ylä-Herttuala S** (2001). EC-SOD gene therapy reduces paracetamol-induced liver damage in mice. *J Gene Med.*;3: 321-325.
- Laurila JP, Castellone MD, Curcio A, Laatikainen LE, Haaparanta-Solin M, Gronroos TJ, Marjamäki P, Martikainen S, Santoro M, Laukkanen MO** (2009). Extracellular superoxide dismutase is a growth regulatory mediator of tissue injury recovery. *MolecularTherapy.*; 17:448-454.
- Laurila JP, Laatikainen LE, Castellone MD, Laukkanen MO** (2009). SOD3 reduces inflammatory cell migration by regulating adhesion molecule and cytokine expression. *PLoS ONE.*;4:e5786.
- Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, Vitali SH, Vergadi E, Konstantinou G, Sdrimas K, Fernandez-Gonzalez A, Kourembanas S** (2012). Exosomes mediate the Cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation.*;126(22):2601-11.
- Lee EW, Michalkiewicz M, Kitlinska J, Kalezić I, Switalska H, Yoo P, Sangkharat A, Ji H, Li L, Michalkiewicz T, Ljubisavljevic M, Johansson H, Grant DS, Zukowska Z** (2003). Neuropeptide Y induces ischemic angiogenesis and restores function of ischemic skeletal muscles. *J Clin Invest.*;111:1853-62.
- Li M, Knight DA, A Snyder L, Smyth MJ, Stewart TJ** (2013). A role for CCL2 in both tumor progression and immunosurveillance. *Oncoimmunology.*;2:e25474.
- Li H, Horke S, Förstermann U** (2014). Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis.*; 237:208-19.

Liu, X., Xu, Y., Meng, Q., Zheng, Q., Wu, J., Wang, C., Jia, W., Figeys, D., Chang, Y., and Zhou, H (2016). Proteomic analysis of minute amount of colonic biopsies by enteroscopy sampling. *Biochem Biophys Res Commun.*;476:286-92.

Loberg RD, Ying C, Craig M, Day LL, Sargent E, Neeley C, Wojno K, Snyder LA, Yan L, Pienta KJ (2007). Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo. *Cancer Res.*;67:9417-24.

Luoma JS, Stralin P, Marklund SL, Hiltunen TP, Särkioja T, Ylä-Herttuala S (1998). Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;18:157-67.

Maja Osmak (2012). Statins and cancer: Current and future prospects. *Cancer Letters.*; 324: 1-12.

Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C and Locati M (2009). Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum Immunol.*; 70: 325-330.

Manzur M, Hamzah J, Ganss R (2009). Modulation of G Protein Signaling Normalizes Tumor Vessels. *Cancer research.*;69:396-9.

Marklund SL (1984)a. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest.*;74:1398-1403.

Marklund SL (1984)b. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J.*;222:649-655.

Marklund SL (1992). Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J. Biol. Chem.*; 267: 6696-6701.

Marklund SL, Hagglof B (1984). Plasma EC-superoxide dismutase activity in insulin-dependent diabetic children. *Clin. Chim. Acta*, 142:299-305.

Martirosyan A, Clendening JW, Goard CA, Penn LZ (2010). Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance. *BMC Cancer.*;18;10:103.

McCarey, D.W.; McInnes, I.B.; Madhok, R.; Hampson, R.; Scherbakov, O.; Ford, I.; Capell, H.A. and Sattar, N (2004). Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet.*; 363:2015-2021.

McEver, R (2015). P. Selectins: initiators of leukocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc. Res.*; 107:331-339.

Min KW, Kwon MJ, Park HS, Park Y, Yoon SK, Yoon JB (2005). CAND1 enhances deneddylation of CUL1 by COP9 signalosome. *Biochem Biophys Res Commun.*;334:867-74.

Mira E, Mañes S (2009). Immunomodulatory and anti-inflammatory activities of statins. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.*;9:237-47.

Mira, E.; Leon, B.; Barber, D.F.; Jimenez-Baranda, S.; Goya, I.; Almonacid, L.; Marquez, G.; Zaballos, A.; Martinez, A.C.; Stein, J.V.; Ardavin, C. and Mañes, S (2008). Statins induce regulatory T cell recruitment via a CCL1 dependent pathway. *J. Immunol.*; 181: 3524-3534.

Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, De Palma A, Mauri P, Monegal A, Rescigno M, Savino B, Colombo P, Jonjic N, Pecanic S, Lazzarato L, Fruttero R, Gasco A, Bronte V, Viola A (2011). Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med.*;208:1949-62.

Moncada S, Higgs EA (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.*;(176 Pt 1):213-54.

Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, Milosevic J, Tkacheva OA, Divito SJ, Jordan R, Lyons-Weiler J, Watkins SC, Morelli AE (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*.; 119:756-766.

Muller, W. A (1995). The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.*;57:523-528.

Müller-Schweinitzer E, Müller SE, Reineke DC, Kern T, Carrel TP, Eckstein FS, Grapow MT (2010). Reactive oxygen species mediate functional differences in human radial and internal thoracic arteries from smokers. *J Vasc Surg.*;51:438-44.

Murphy JE, Morales RE, Scott J and Kupper TS (2003). IL-1 alpha, innate immunity, and skin carcinogenesis: the effect of constitutive expression of IL-1 alpha in epidermis on chemical carcinogenesis. *J Immunol.*; 170: 5697- 5703.

Myung-Ja Kwon, ByungHak Kim, Yun Sang Lee, Tae-Yoon Kim (2012). Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation. *Journal of Dermatological Science.*; 67:81-7.

Nanni P, Pupa SM, Nicoletti G, De Giovanni C, Landuzzi L, Rossi I, Astolfi A, Ricci C, De Vecchi R, Invernizzi AM, Di Carlo E, Musiani P, Forni G, Menard S and Lollini PL (2000). p185(neu) protein is required for tumor and anchorage-independent growth, not for cell proliferation of transgenic mammary carcinoma. *Int J Cancer.*; 87: 186-194.

Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, Lochnit G, Preissner KT, Zoller M (2010). Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosomeinduced endothelial cell activation. *Cancer research.*; 70:1668-1678.

Nesbit M, Schaidler H, Miller TH, Herlyn M. Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells (2001). *J Immunol*;166:6483–90.

Nguyen AD, Itoh S, Jeney V, Yanagisawa H, Fujimoto M, Ushio-Fukai M, Fukai T (2004). Fibulin-5 is a novel binding protein for extracellular superoxide dismutase. *Circ Res.*;95:1067-74.

Niwa S, Totsuka T, Hayashi S (1996). Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int J Immunopharmacol.*;18:669-75.

Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, Carazo JM and Pascual-Montano A (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.*; 37: W317-322.

Nourshargh, S., Krombach, F. & Dejana, E (2006). The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J.Leukoc. Biol.*;80:714-718.

Nyberg P, Salo T, Kalluri R (2008). Tumor microenvironment and angiogenesis. *Front Biosci.*;13:6537-53.

Oeckinghaus A, Ghosh S (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*;1:a000034.

Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S (2011). Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nat Immunol.*;12:695-708.

Oelkrug C, Ramage JM (2014). Enhancement of T cell recruitment and infiltration into tumours. *Clin Exp Immunol.*;178:1-8.

Ohh M, Kim WY, Moslehi JJ, Chen Y, Chau V, Read MA, Kaelin WG Jr (2002). An intact NEDD8 pathway is required for Cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO Rep.*;3:177-82. Epub 2002 Jan 29.

- Ohta H, Adachi T, Hirano K** (1994). Internalization of human extracellular-superoxide dismutase by bovine aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med.*;16:501-7.
- Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K** (2003). Monocyte chemoattractant protein-1a expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol*, 22:773-778.
- Ookawara T, Eguchi H, Nishimura M, Kizaki T, Takayama E, Saitoh D, Ohno H, Suzuki K** (2003). Effects of oxidative stress on the nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun.*; 303:914 -919.
- Ookawara T, Imazeki N, Matsubara O, Kizaki T, Oh-Ishi S, Nakao C, Sato Y, Ohno H** (1998). Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol.*;275:C840-7.
- Ookawara T, Kizaki T, Takayama E, Imazeki N, Matsubara O, Ikeda Y, Suzuki K, Li Ji L, Tadakuma T, Taniguchi N, Ohno H** (2002). Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*; 296:54-61.
- Oshikawa J, Urao N, Kim HW, Kaplan N, Razvi M, McKinney R, Poole LB, Fukai T, Ushio-Fukai M** (2010). Extracellular SODderived H₂O₂ promotes VEGF signaling in caveolae/lipid rafts and post-ischemic angiogenesis in mice. *PLoS ONE.*; 5:e10189.
- Osmak M** (2012). Statins and cancer: current and future prospects. *Cancer Lett.*; 324:1-12.
- Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK** (2004). Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature.*; 427:695.
- Peña CG, Nakada Y, Saatcioglu HD, Aloisio GM, Cuevas I, Zhang S, Miller DS, Lea JS, Wong KK, DeBerardinis RJ, Amelio AL, Brekken RA, Castrillon DH** (2015). LKB1 loss promotes endometrial cancer progression via CCL2-dependent macrophage recruitment. *J Clin Invest.*;125:4063-76.
- Peter Baluk, Hiroya Hashizume, Donald M McDonald** (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current Opinion in Genetics and Development.*;15:102-111.
- Petersen SV, Oury TD, Ostergaard L, Valnickova Z, Wegrzyn J, Thøgersen IB, Jacobsen C, Bowler RP, Fattman CL, Crapo JD, Enghild JJ** (2004). Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. *J Biol Chem.*;279:13705-10.
- Pierce NW, Lee JE, Liu X, Sweredoski MJ, Graham RL, Larimore EA, Rome M, Zheng N, Clurman BE, Hess S, Shan SO, Deshaies RJ** (2013). Cdc1 promotes assembly of new SCF complexes through dynamic exchange of F box proteins. *Cell.*;153:206-15.
- Podust VN, Brownell JE, Gladysheva TB, Luo RS, Wang C, Coggins MB, Pierce JW, Lightcap ES, Chau V** (2000). A Nedd8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27Kip1 by ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;97:4579-84.
- Pollard JW** (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.*;4:71-78.
- Pomerantz JL, Baltimore D** (2002) Two pathways to NF-κB. *Mol Cell* 10:693-701.
- Prasad, R.; Giri, S.; Nath, N.; Singh, I. and Singh, A.K** (2005). Inhibition of phosphoinositide 3 kinase-Akt (protein kinase B)-nuclear factor-kappa B pathway by lovastatin limits endothelialmonocyte cell interaction. *J. Neurochem.*; 94: 204-214.
- Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW** (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.*;475:222-5.

Qian BZ, Pollard JW (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.*; 141:39-51.

Qian Peng, Mei Li, Zi Wang, Ming Jiang, Song Lei, Hui Zhang, Wei Zhang, Yan-Yang Liu, Feng Luo (2013). Polarization of tumor-associated macrophage is associated with tumor vascular normalization by endostatin. *Thoracic Cancer.*; 4: 295-305.

Rahman A, Fazal F (2011). Blocking NF- κ B: an inflammatory issue. *Proc Am Thorac Soc.*;8:497-503.

Rajeev K. Shrimali, Zhiya Yu, Marc R. Theoret, Dhanalakshmi Chinnasamy, Nicholas P. Restifo and Steven A. Rosenberg (2010). Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res.*; 70:6171-6180.

Read MA, Brownell JE, Gladysheva TB, Hottelet M, Parent LA, Coggins MB, Pierce JW, Podust VN, Luo RS, Chau V, Palombella VJ (2000). Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(betaTrCP)-dependent ubiquitination of IkappaBalpha. *Mol Cell Biol.*;20:2326-33.

Reymond N, Imbert AM, Devillard E, Fabre S, Chabannon C, Xerri L, Farnarier C, Cantoni C, Bottino C, Moretta A, Dubreuil P, Lopez M (2004). DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions. *J. Exp. Med.*;199:1331-1341.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.*; 391:79-82.

Rodney J. Folz, James D. Crapo (1994). Extracellular Superoxide Dismutase (SOD3): Tissue-Specific Expression, Genomic Characterization, and Computer-Assisted Sequence Analysis of the Human EC SOD Gene. *Genomics Volume.*; 22:162-171.

Rollins BJ, Sunday ME (1991). Suppression of tumor formation in vivo by expression of the JE gene in malignant cells. *Mol Cell Biol.*;11:3125-31.

Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C, Squadrito ML, Segura I, Li X, Knevels E, Costa S, Vinckier S, Dresselaer T, Akerud P, De Mol M, Salomäki H, Phillipson M, Wyns S, Larsson E, Buysschaert I, Botling J, Himmelreich U, Van Ginderachter JA, De Palma M, Dewerchin M, Claesson-Welsh L, Carmeliet P (2011). HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell.*; 19: 31-44.

Romano, M.; Diomedede, L.; Sironi, M.; Massimiliano, L.; Sottocorno, M.; Polentarutti, N.; Guglielmotti, A.; Albani, D.; Bruno, A.; Fruscella, P.; Salmona, M.; Vecchi, A.; Pinza, M. and Mantovani, A (2000). Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest.*; 80:1095-1100.

Roudier E, Mistafa O, Stenius U (2006). Statins induce mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated inhibition of Akt signaling and sensitize p53-deficient cells to cytostatic drugs. *Mol Cancer Ther.*;5:2706-15.

Roy, H., Bhardwaj, S., Babu, M., Jauhainen, S., Herzig, K.H., Bellu, A.R., Haisma, H.J., Carmeliet, P., Alitalo, K., and Yla-Herttuala, S (2005). Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A. *Hum Gene Ther.*; 16: 1422–1428.

Rozados VR, Hinrichsen LI, Binda MM, Gervasoni SI, Matar P, Bonfil RD, Scharovsky OG (2008). Lovastatin enhances the antitumoral and apoptotic activity of doxorubicin in murine tumor models. *Oncol Rep.*;19:1205-11.

Ryschich E, Schmidt J, Hammerling GJ, Klar E, Ganss R (2002). Transformation of the microvascular system during multistage tumorigenesis. *Int J Cancer.*;97:719-25.

Safwat S, Ishak RA, Hathout RM, Mortada ND (2017). Statins anticancer targeted delivery systems: re-purposing an old molecule. *J Pharm Pharmacol.*;69:613-624.

- Samples J, Willis M, Klauber-DeMore N** (2013). Targeting angiogenesis and the tumor microenvironment. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*; 22: 629-639.
- Sánchez-Madrid, F and del Pozo, MA** (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.*; 18: 501-511.
- Sarrabayrouse G, Pich C, Teiti I, Tilkin-Mariame AF** (2017). Regulatory properties of statins and rho gtpases prenylation inhibitors to stimulate melanoma immunogenicity and promote anti-melanoma immune response. *Int J Cancer.*;140:747-755.
- Scavenius C, Petersen JS, Thomsen LR, Poulsen ET, Valnickova-Hansen Z, Bowler RP, Oury TD, Petersen SV, Enghild JJ** (2013). Murine extracellular superoxide dismutase is converted into the inactive fold by the Ser195Cys mutation. *Biochemistry.*;52:3369-75.
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M. & Muller, W. A** (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol.*;3:143-150.
- Schulte D, Küppers V, Dartsch N, Broermann A, Li H, Zarbock A, Kamenyeva O, Kiefer F, Khandoga A, Massberg S, Vestweber D** (2011). Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. *EMBO J.*;30:4157-4170.
- Senovilla L, Aranda F, Galluzzi L, Kroemer G** (2014). Impact of myeloid cells on the efficacy of anticancer chemotherapy. *Curr Opin Immunol.*;30:24-31.
- Shalapour S, Karin M** (2015). Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest.*; 125:3347-55.
- Shi C, Pamer EG** (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.*;11:762-74.
- Shrihari TG** (2016). Inflammation related cancer-Highlights. *J Carcinogenesis Mutagenesis.*;7:1-2.
- Shrihari TG** (2017). Dual role of inflammatory mediators in cancer. *Ecancermedicalscience.*;11:721.
- Shrimali RK, Yu Z, Theoret MR, Chinnasamy D, Restifo NP, Rosenberg SA** (2010). Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res.*;70:6171-80.
- Simpson RJ, Jensen SS and Lim JWE** (2008). Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics.*; 8:4083-4099.
- Singh B, Bhat HK** (2012). Superoxide dismutase 3 is induced by antioxidants, inhibits oxidative DNA damage and is associated with inhibition of estrogen induced breast cancer. *Carcinogenesis.*;33:2601-10.
- Smith, C.; Halvorsen, B.; Otterdal, K.; Waehre, T.; Yndestad, A.; Fevang, B.; Sandberg, W.J.; Breland, U.M.; Froland, S.S.; Oie, E.; Gullestad, L.; Damas, J.K. and Aukrust, P** (2008). High levels and inflammatory effects of soluble CXC ligand 16 (CXCL16) in coronary artery disease: down-regulatory effects of statins. *Cardiovasc. Res.*; 79:195-203.
- Sobrevia L, Ooi L, Ryan S, Steinert JR** (2016). Nitric Oxide: A Regulator of Cellular Function in Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev.*;2016:9782346.
- Stalker, T.J.; Lefer, A.M. and Scalia, R** (2001). A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. *Br. J. Pharmacol.*; 133:406-412.
- Stan, R. V., Tkachenko, E. & Niesman, I. R** (2004). PV1 is a key structural component for the formation of the stomatal and fenestral diaphragms. *Mol. Biol. Cell.*; 15:3615-3630.

Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL (1995). The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;15:2032-6.

Stralin P, Marklund SL (2000). Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.*; 151: 433-441.

Stralin P, Marklund SL (2001). Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 281:H1621-H1629.

Strijdom, H., Muller, C., and Lochner, A. (2004). Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *J Mol Cell Cardiol.*;37:897-902.

Su SA, Xie Y, Fu Z, Wang Y, Wang JA, Xiang M (2017). Emerging role of exosome-mediated intercellular communication in vascular remodeling. *Oncotarget.*;8:25700-25712.

Sucharita Sen-Banerjee, Samy Mir, Zhiyong Lin, Anne Hamik, G. Brandon Atkins, Hiranmoy Das, Pallab Banerjee, Ajay Kumar, Mukesh K. Jain (2005). Kruppel-Like Factor 2 as a Novel Mediator of Statin Effects in Endothelial Cells. *Circulation.*; 112:720-726.

Su SA, Xie Y, Fu Z, Wang Y, Wang JA, Xiang M (2017). Emerging role of exosome-mediated intercellular communication in vascular remodeling. *Oncotarget.* ;8:25700-25712.

Suh JG, Takai S, Yamanishi T, Kikuchi T, Folz RJ, Tanaka K, Oh YS, Wada K (1997). Sequence analysis, tissue expression and chromosomal localization of a mouse secreted superoxide dismutase gene. *Mol Cells.*;7:204-7.

Sullivan R, Paré GC, Frederiksen LJ, Semenza GL, Graham CH (2008). Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Cancer Ther.*;7:1961-73.

Svensk AM, Soini Y, Pääkkö P, Hiravikoski P, Kinnula VL (2004). Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol.*;122:395-404.

Tadokoro H, Umezu T, Ohyashiki K, Hirano T and Ohyashiki JH (2013). Exosomes derived from Hypoxic Leukemia Cells Enhance Tube Formation in Endothelial Cells. *JBiol Chem.*; 288:34343-34351.

Tanaka M, Kogawa K, Nakamura K, Nishihori Y, Kuribayashi K, Hagiwara S, Muramatsu H, Sakamaki S, Niitsu Y (2001). Anti-metastatic gene therapy utilizing subcutaneous inoculation of EC-SOD gene transduced autologous fibroblast suppressed lung metastasis of Meth-A cells and 3LL cells in mice. *GeneTherapy.*; 8:149-156.

Tardáguila M, Mira E, García-Cabezas MA, Feijoo AM, Quintela-Fandino M, Azcoitia I, Lira SA, Mañes S (2013). CX3CL1 promotes breast cancer via transactivation of the EGF pathway. *Cancer Res.*;73:4461-73.

Taylor DD, Gercel-Taylor C (2011). Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Seminars in immunopathology.*; 33:441-454.

Telma Lança and Bruno Silva-Santos (2012). The split nature of tumor-infiltrating leukocytes. Implications for cancer surveillance and immunotherapy. *Oncoimmunology.*;1: 717-725.

Teoh M. L. T., Sun W., Smith B. J., Oberley L. W., Cullen J. J (2007). Modulation of reactive oxygen species in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research.*; 13:7441-7450.

Teoh ML, Fitzgerald MP, Oberley LW, Domann FE (2009). Overexpression of extracellular superoxide dismutase attenuates heparanase expression and inhibits breast carcinoma cell growth and invasion. *Cancer Res.*;69(15):6355-63.

- Teoh-Fitzgerald ML, Fitzgerald MP, Zhong W, Askeland RW, Domann FE** (2014). Epigenetic reprogramming governs EcSOD expression during human mammary epithelial cell differentiation, tumorigenesis and metastasis. *Oncogene*. 16;33:358-68.
- Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwillle P, Brügger B, Simons M** (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*.;319:1244-7.
- Turcotte S, Gros A, Hogan K, Tran E, Hinrichs CS, Wunderlich JR, Dudley ME, Rosenberg SA** (2013). Phenotype and function of T cells infiltrating visceral metastases from gastrointestinal cancers and melanoma: implications for adoptive cell transfer therapy. *J Immunol*.; 191:2217-2225.
- Ulrich Laufs, Vito La Fata, Jorge Plutzky, James K. Liao** (1998). Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by HMG CoA Reductase Inhibitors. *Circulation*.;97:1129-1135.
- Umezumi T, Tadokoro H, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K and Ohyashiki JH** (2014). Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood*.;124:3748- 3757.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO** (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. J;9:654-9.
- van Buul, J. D., Kanters, E. & Hordijk, P. L** (2007). Endothelial signaling by Ig-like cell adhesion molecules. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*.;27:1870-1876.
- van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S and Raposo G** (2006). Exosomes: A common pathway for a specialized function. *J Biochem*.;140:13-21.
- Varela, I.; Pereira, S.; Ugalde, A.P.; Navarro, C.L.; Suarez, M.F.; Cau, P.; Cadinanos, J.; Osorio, F.G.; Foray, N.; Cobo, J.; de Carlos, F.; Levy, N.; Freije, J.M. and Lopez-Otin, C** (2008). Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat. Med*.;14:767-772.
- Veillard, N.R.; Braunersreuther, V.; Arnaud, C.; Burger, F.; Pelli, G.; Steffens, S. and Mach, F** (2006). Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis*.; 188: 51-58.
- Verheul HM, Voest EE, Schlingemann RO** (2004). Are tumours angiogenesis-dependent? *J Pathol*.; 202:5-13.
- Dietmar Vestweber** (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature Reviews Immunology*.;15:692–704.
- Vicente-Manzanares M., Sanchez-Madrid F** (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol*.;4:110-122.
- Wang X, Huang W, Liu G, Cai W, Millard RW, Wang Y, Chang J, Peng T, Fan GC** (2014). Cardiomyocytes mediate anti-angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR-320 into endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*.;74:139-50.
- Wang CA, Harrell JC, Iwanaga R, Jedlicka P, Ford HL** (2014). Vascular endothelial growth factor C promotes breast cancer progression via a novel antioxidant mechanism that involves regulation of superoxide dismutase 3. *Breast Cancer Research*.; 30;16(5):462.
- Wang Y, Takeishi K, Li Z, Cervantes-Alvarez E, Collin de l'Hortet A, Guzman-Lepe J, Cui X, Zhu J** (2017). Microenvironment of a tumor-organoid system enhances hepatocellular carcinoma malignancy-related hallmarks. *Organogenesis*.;26:1-12.
- Wegmann F, Petri B, Khandoga AG, Moser C, Khandoga A, Volkery S, Li H, Nasdala I, Brandau O, Fässler R, Butz S, Krombach F, Vestweber D** (2006). ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho and VEGF-induced vascular permeability. *J. Exp. Med*.;203:1671-1677.

Weis M, Heeschen C, Glassford AJ and Cooke JP (2002). Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation.*; 105: 739-745.

Weitz-Schmidt, G.; Welzenbach, K.; Brinkmann, V.; Kamata, T.; Kallen, J.; Bruns, C.; Cottens, S.; Takada, Y. and Hommel, U (2001). Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat. Med.*; 7:687-692.

Wessel F, Winderlich M, Holm M, Frye M, Rivera-Galdos R, Vockel M, Linnepe R, Ipe U, Stadtmann A, Zarbock A, Nottebaum AF, Vestweber D (2014). Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol.*;15:223-30.

Wheeler MD, Smutney OM, Samulski RJ (2003). Secretion of extracellular superoxide dismutase from muscle transduced with recombinant adenovirus inhibits the growth of B16 melanomas in mice. *Molecular Cancer Research.* 1: 871-881.

Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae SS, Booth MF, Garkavtsev I, Xu L, Hicklin DJ, Fukumura D, di Tomaso E, Munn LL, Jain RK (2004). Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell.*; 6:553-63.

Witz IP (2006). Tumor-microenvironment interactions: the selectin-selectin ligand axis in tumor-endothelium cross talk. *Cancer Treat Res.*;130:125-40.

Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ (2002). HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia.*; 16, 508-519.

Yadav A, Saini V, Arora S (2010). MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta.*;411:1570-9.

Yamada H, Yamada Y, Adachi T, Goto H, Ogasawara N, Futenma A, Kitano M, Miyai H, Fukatsu A, Hirano K, Kakumu S (1997). Polymorphism of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) gene: relation to the mutation responsible for high EC-SOD level in serum. *Jpn J Hum Genet.*;42:353-6.

Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, Andersen JS, Mann M, Mercurio F, Ben-Neriah Y (1998). Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature.*;396:590-594.

Yoshida M, Sawada T, Ishii H (2001). HMG-CoA reductase inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow conditions in vitro: involvement of Rho GTPase-dependent mechanism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*;21:1165-1171.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expressio. *Free Radic Biol Med.*;33:337-49.

Zhang J, Patel L, Pienta KJ (2010). CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev.*;21:41-8.

Zheng J, Yang X, Harrell JM, Ryzhikov S, Shim EH, Lykke-Andersen K, Wei N, Sun H, Kobayashi R, Zhang H (2002). CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol Cell.*;10:1519-26.

Zineh, I.; Luo, X.; Welder, G.J.; Debella, A.E.; Wessel, T.R.; Arant, C.B.; Schofield, R.S. and Chegini, N (2006). Modulatory effects of atorvastatin on endothelial cell-derived chemokines, cytokines, and angiogenic factors. *Pharmacotherapy.*; 26: 333-340.

ANEXO

